

**Zur Bedeutung tertiärer Anomalien
für die Beurteilung der Spermienmorphologie**

Thomas Würgau

München 1986

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. W. Leidl

Zur Bedeutung tertiärer Anomalien
für die Beurteilung der Spermienmorphologie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Thomas Würgau
aus
Berlin

1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Priv.Do. Dr. Dr. habil. A. Pospischil

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1. Entstehungsorte anomaler Spermien	2
2.2. Morphologische Darstellungsmethoden	3
2.3. Auswirkungen auf Samenzellen in vitro durch den Einfluß spezifischer Noxen	6
2.3.1. Temperaturerniedrigung	6
2.3.2. Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration	10
2.3.3. Veränderung des osmotischen Druckes	12
3. Untersuchte Tiere und Methoden	16
3.1. Untersuchte Tiere	16
3.2. Spermagewinnung	16
3.3. Spermauntersuchung	17
3.3.1. Untersuchung des nativen Spermias	17
3.3.2. Untersuchung im verdünnten Sperma	18
3.4. Die gesetzten Noxen	19
3.4.1. Temperaturerniedrigung	20
3.4.2. Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration	23
3.4.3. Veränderung der Osmolalität	24
3.5. Fixierung der Spermien zur morphologischen Beurteilung	25
3.5.1. Färbung nach Farelly	25
3.5.2. Flüssigfixierung nach Hancock	28
3.6. Lichtmikroskopische Untersuchungsmethoden	29
3.7. Morphologische Spermaparameter	30
3.7.1. Schema zur morphologischen Beurteilung	32
3.7.2. Akrosomenmorphologie	34
3.7.3. Photographische Darstellung der Akrosomen- alterationen	35
3.8. Statistische Methoden	36

4.	Ergebnisse	37
4.1.	Parameter der Nativ - Ejakulate	37
4.2.	Einfluß der Noxe Temperaturerniedrigung auf Motilität, Vitalität und Morphologie	39
4.2.1.	Bulle	39
4.2.2.	Schafbock	42
4.2.3.	Ziegenbock	44
4.2.4.	Hengst	46
4.2.5.	Eber	48
4.2.6.	Tierartlicher Vergleich	51
4.3.	Einfluß der Noxe Wasserstoffionenkonzentration auf Motilität, Vitalität und Morphologie	53
4.3.1.	Bulle	53
4.3.2.	Schafbock	56
4.3.3.	Ziegenbock	58
4.3.4.	Hengst	60
4.3.5.	Eber	62
4.3.6.	Tierartlicher Vergleich	65
4.4.	Einfluß der Noxe Osmolalität auf Motilität, Vitalität und Morphologie	67
4.4.1.	Bulle	67
4.4.2.	Schafbock	71
4.4.3.	Ziegenbock	74
4.4.4.	Hengst	78
4.4.5.	Eber	81
4.4.6.	Tierartlicher Vergleich	85
4.5.	Vergleich der Auswertungsverfahren	87
4.5.1.	Flüssigfixierung Phasenkontrast / Differential- Interferenzkontrast	87
4.5.2.	Flüssigfixierung Phasenkontrast / Färbung Fareilly Hellfeld	88

	Seite
5. Diskussion	97
6. Zusammenfassung	107
7. Summary	109
8. Literaturverzeichnis	111



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0046

1. Einleitung

Die quantitative Erfassung von Samenzellen mit morphologischen Anomalien ist ein wesentlicher Bestandteil der Spermauntersuchung. Formveränderungen an den Spermatozoen können in Hoden (primär), Nebenhoden und den samenleitenden Organen (sekundär) sowie durch Einwirkung verschiedener Noxen nach der Ejakulation (tertiär) entstehen.

Während die Genese primärer und sekundärer Anomalien biologischen Gesetzmäßigkeiten unterliegt, kommen als Ursache tertiärer Anomalien sehr unterschiedliche Umwelteinflüsse in Betracht.

Für die Praxis der Samengewinnung, -untersuchung und -konservierung sind Veränderungen im Ejakulat bezüglich Temperatur, Tonizität und Wasserstoffionenkonzentration besonders relevant.

Aufgabe dieser Arbeit war es, am Modell definierter Noxen deren Einflüsse auf die Spermienmorphologie zu untersuchen, um festzustellen inwieweit sie in der Routinediagnostik berücksichtigt werden müssen. In diesem Zusammenhang sollten neben unterschiedlichen Präparationstechniken verschiedene mikroskopische Darstellungsverfahren überprüft werden.

2. Literatur

2.1. Entstehungsorte anomaler Spermien

Ein einfaches und auch in der Praxis häufig angewandtes Schema zur Klassifizierung morphologisch anomaler Spermien richtet sich nach dem Ort ihrer Entstehung (LEIDL et al., 1971). Es wird zwischen normal ausgebildeten Samenzellen, primären und sekundären Anomalien unterschieden.

In der Gruppe der primären Anomalien werden morphologische Abweichungen der Spermien, die auf Störungen im Verlauf der Spermatogenese zurückzuführen sind, zusammengefaßt. Es handelt sich hierbei um testikulär entstandene Anomalien. Unter sekundären Anomalien versteht man Formabweichungen als Folge von Funktionsstörungen der Nebenhoden, der samenabführenden Wege und der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, also posttestikulär bedingte Anomalien (STOLLA, 1984).

Extragenital verursachte morphologische Veränderungen der Samenzellen, die durch unphysiologische Einflüsse auf das Ejakulat in vitro, wie z.B. durch Verarbeitungsprozesse bei der Konservierung oder im Laufe der Spermauntersuchung auftreten können, werden als Artefakte oder tertiäre Anomalien bezeichnet (MELROSE, 1962; ROBERTS, 1971; DOTT, 1975; MOSS et al., 1979).

Andere Autoren fassen diese Gruppe mit den sekundären Anomalien zusammen (WILLIAMS und SAVAGE, 1925; LAGERLÖF, 1934; BLOM, 1950).

2.2. Morphologische Darstellungsmethoden

Die gebräuchlichsten Darstellungsmethoden zur routinemäßigen Untersuchung der Spermienmorphologie sind Hellfeldbetrachtungen fixierter und gefärbter Ausstriche (LAGERLÖF, 1934; BLOM, 1943; KARRAS, 1965; MELROSE und LAING, 1970).

Daneben werden immer häufiger Verfahren angewandt, bei denen mit Hilfe der Phasenkontrast- oder Differential-Interferenzkontrast-Mikroskopie ungefärbte, native oder flüssigfixierte Präparate morphologisch ausgewertet werden (HANCOCK, 1956; SAAKE und MARSHALL, 1968; PURSEL und JOHNSON, 1974; OKO et al., 1976; MARSHALL, 1978).

Von einigen Autoren wurden Vor- und Nachteile dieser Verfahren - besonders im Hinblick auf die bei der Präparation entstehenden Artefakte - beschrieben. Neben der Technik, die zur Herstellung eines Nativausstriches angewandt wird (SALISBURY et al., 1942) und der Toxizität der Farbstoffe (ELIASSON, 1977; MENGER, 1983) ist die Methode der Fixierung von Bedeutung (MERCIER und SALISBURY, 1947; RAO, 1957; BOLLWAHN und GROVE, 1972). Auch eine der Fixierung vorangehende Inkubation bzw. Lagerung des Spermas wird für das vermehrte Auftreten von Artefakten verantwortlich gemacht (MUKHERJEE, 1963).

Vergleichende Untersuchungen an Bullenspermien mit drei Färbungen (Eosin Y-Nigrosin, Eosin B-Nigrosin, Eosin B-Fast Green FCF) und zwei Flüssigfixierungen (gepufferte Formolsalzlösung, gepufferte Glutaraldehydlösung) wurden von HARASYMOWYCZ et al. (1976) durchgeführt. Die Färbungen wurden im Hellfeld, die flüssigfixierten Präparate mittels Differential-Interferenzkontrast ausgewertet. Der prozentuale Anteil loser Köpfe ($P < 0,05$) und Akrosomenalterationen ($P < 0,01$) lag in den Färbungen höher als in den flüssigfixierten Proben. Proximale Zytoplasmatröpfchen kamen nur bei Glutaraldehyd-, nicht jedoch bei Formolsalzfizierung vermehrt vor ($P < 0,01$). Anomalien des Kopfes wurden in beiden Flüssigfixierungen in deutlich höherem Prozentsatz aufgefunden ($P < 0,01$).

Zur Ermittlung der artefaktärmsten Darstellungsmethode werteten KNAUS und SHANDOMO (1977) Eber- und Kaninchenejakulate in flüssigfixierten Proben (Formolsalzlösung) mit Phasenkontrast und Differential-Interferenzkontrast sowie gefärbte Präparate (Kopfkappenfärbung nach Karras, Giemsa Färbung nach Watson) im Hellfeld aus. Sie kamen zu der Ansicht, daß in der Flüssigfixierung keine Artefakte auftreten, dagegen die färberische Darstellung oft zu "Kunstprodukten" an Kopfkappe und Hals führt. Weiterhin kommt es nach ihren Erfahrungen in gefärbten Ausstrichpräparaten zur Ablösung von Zytoplasmatröpfchen und "Nichtdarstellung" halb-kreisförmiger Schwanzkrümmlinge.

CAMPBELL et al. (1960) verglichen an Bullenspermien flüssigfixierte (Formolsalzlösung), in Agar eingebettete Proben mit

Eosin-Nigrosin gefärbten Präparaten. Der Anteil der Krümmlinge und Zytoplasmatröpfchen war bei Flüssigfixierung signifikant erhöht. Lose Köpfe traten vermehrt im gefärbten Präparat auf.

Bei Untersuchungen ungefärbter und nach Karras gefärbter Ausstriche von Bullenspermien im Phasenkontrast bzw. im Hellfeld, bezeichneten HAASE et al. (1977) den höheren Prozentsatz an Kopfkappenveränderungen in den gefärbten Präparaten als Kunstprodukte.

Auch HURTGEN et al. (1980) konnten in einer Färbung (Eosin-Nigrosin) Akrosomenanomalien an Eberspermien nachweisen, die in einer in Formolsalzlösung fixierten Probe nicht auftraten. Unterschiede in der Anzahl der Zytoplasmatröpfchen stellten sie nicht fest.

Vergleichende Untersuchungen zwischen flüssigfixierten Proben (Formolsalzlösung) und gefärbten Ausstrichen (William's stain) wurden auch beim Schafbock durchgeführt (CAMERON, 1977). Es zeigte sich, daß keine Unterschiede bezüglich Schwanz- und Mittelstückanomalien bestanden, jedoch der Anteil an Zytoplasmotropfen im flüssigfixierten Präparat deutlich erhöht war.

Die Lagerfähigkeit von Samenproben, die in Glutaraldehydlösung fixiert waren, beschrieben JOHNSON et al. (1976) sowie PURSEL et al. (1974). Selbst nach 19 bzw. 24 Tagen konnten keine Abweichungen im Prozentsatz intakter Akrosome bei Bulle und Eber gefunden werden.

Die Absorption von Vitalfarbstoffen (Eosin-Nigrosin) entspricht auch nach Flüssigfixierung und Lagerung des Samens jener, die im nativen Sperma festgestellt wurde (DOTT und FOSTER, 1975; SEKONI et al., 1981).

2.3. Auswirkungen auf Samenzellen in vitro durch den Einfluß spezifischer Noxen

2.3.1. Temperaturerniedrigung

Samenzellen, die einer rapiden Abkühlung auf eine Temperatur unter +15° C ausgesetzt sind, reagieren mit dem irreversiblen Verlust ihrer Motilität und Stoffwechselaktivität. Dieser Vorgang wird als Kälteschock beschrieben (BLACKSHAW, 1954; CHOONG und WALES, 1962).

Es kommt zu Membrananrissen (WALTON, 1957), intrazelluläre Proteine und Enzyme treten aus (MANN und LUTWAK-MANN, 1981) und die intrazelluläre Ionenzusammensetzung ändert sich (BLACKSHAW und SALISBURY, 1957; QUINN und WHITE, 1966). Gleichzeitig erhöht sich die Membranpermeabilität für Farbstofflösungen (HANCOCK, 1951).

Morphologische Veränderungen der Samenzelle werden hauptsächlich am Akrosom beobachtet. Das Ausmaß der Schädigung wird in unterschiedliche Stadien der Schwellung und Ablösung eingeteilt (HANCOCK, 1956; BOENDER, 1968; WATSON und MARTIN, 1972; TASSERON et

al., 1977, AALSETH und SAAKE, 1985). Neben den Akrosomenalterationen lassen sich elektronenoptisch Veränderungen der Plasmamembran und der Mitochondrien darstellen (HEALEY, 1969; KUNZE et al., 1971; WARNAWSKI, 1971).

Die Kälteschockempfindlichkeit der Samenzellen einzelner Spezies ist unterschiedlich und von vielen Faktoren abhängig (ONUMA, 1963; WATSON und PLUMMER, 1985). Unter anderem spielen hierbei das Seminalplasma (POLGE, 1956; AALSETH und SAAKE, 1985), die Inkubationszeit vor Eintritt der Noxe (PURSEL et al., 1972a) und vor allem Verdünnerzusätze wie Proteine (CHOONG und WALES, 1962), Eigelb (JONES und MARTIN, 1973), Lecithin (QUINN und WHITE, 1968) und Laktose (PURSEL et al., 1972b) eine Rolle.

Ein Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration des Verdünners wurde von QUINN und WHITE (1968) nachgewiesen. Sperma, das durch Elektroejakulation erhalten wurde, reagierte empfindlicher auf einen Kälteschock als mit der künstlichen Scheide gewonnene Ejakulate (QUINN et al., 1968). Neben der Art der Spermagewinnung scheint auch der Ort der Samenentnahme von Bedeutung zu sein. Nebenhodenspermien sind gegen eine schnelle Abkühlung resistenter als ejakulierte Samenzellen (WALES und WHITE, 1959).

Von einigen Autoren wurden vergleichende Untersuchungen über den Einfluß von Temperaturerniedrigung und Kälteschock bei verschiedenen Spezies durchgeführt. NISHIKAWA (1959) konnte nachweisen, daß sowohl frische als auch verdünnte Hengstspemien bei raschem

Abkühlen auf 0° C mit einem stärkeren Verlust der Vorwärtsbeweglichkeit reagieren als Bullenspermien. WALES und WHITE (1959) verdünnten die Ejakulate verschiedener Spezies mit einem Medium von 0° C und beurteilten die Empfindlichkeit der Spermien gegenüber dieser Noxe mit Hilfe einer Vitalfärbung sowie anhand der Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen. Die deutlichsten Schäden wurden beim Schafbock und - in etwas geringerem Ausmaß - beim Bullen gefunden. Spermien von Rinde und Kaninchenbock reagierten nicht so stark, die geringsten Auswirkungen wurden bei Samenzellen des Mannes beobachtet. CHOONG und WALES (1962) bestätigten mit einer ähnlichen Versuchsanordnung die Ergebnisse bei Schafbock und Bulle. Die Akrosomenalterationen nach Kälteschock und Lagerung wurden von ONUMA (1963) untersucht. Während es beim Eber zu deutlichen Akrosomenschäden kam, konnte er beim Bullen kaum morphologische Veränderungen feststellen und postulierte, daß die Widerstandsfähigkeit des akrosomalen Systems gegen eine Temperaturniedrigung speziesabhängig ist.

Beurteilungen der Morphologie der Spermien nach Temperaturveränderung wurden insbesondere im Zusammenhang mit der Tiefgefrierkonservierung durchgeführt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Samenzellen vor und nach einer Lagerung in flüssigem Stickstoff sind in einer Studie von HEALEY (1969) beschrieben. Er konnte beim Bullen keine Veränderung der Ultrastruktur der Spermien beobachten. Dagegen wurden beim Schafbock sowohl die äußere Membran als auch das Akrosom durch Tiefgefrieren geschädigt. Noch

ausgeprägter waren die Veränderungen am Akrosom des Eberspermiums. Beim Hengst blieb, ähnlich wie beim Bullen, die Struktur der Zelle erhalten. BIELANSKI (1975) konnte dagegen auch an HengstspERMien Veränderungen der Ultrastruktur feststellen.

WARNAWSKI (1971) kommt in bezug auf die gesetzten Schäden am Akrosom während Verdünnung, Äquilibrierung und Tiefgefrieren zu der Aussage daß Schafbockspermien empfindlicher reagieren als Bullenspermien. Beim Schafbock war jedoch trotz eines höheren Anteils geschädigter Akrosome der Verlust der Vorwärtsbeweglichkeit weniger ausgeprägt als beim Bullen. Auch WATSON und MARTIN (1972) fanden nach der Konservierung in flüssigem Stickstoff deutlich stärkere Akrosomenschäden beim Schafbock als beim Bullen.

WATSON und PLUMMER (1985) setzten die Kälteschockempfindlichkeit mit der Form des Spermienkopfes in Verbindung. Hierbei spielen Oberfläche und Größe des Akrosoms eine Rolle. Eberspermien mit der größten projizierten Kopffläche von $37,5 \mu\text{m}^2$ reagieren am stärksten auf Temperaturerniedrigungen gefolgt von Bullen- und Schafbockspermien. HengstspERMien, mit einer Fläche von $15,2 \mu\text{m}^2$ und Samenzellen des Mannes mit $18,8 \mu\text{m}^2$ sind dagegen deutlich weniger empfindlich.

2.3.2. Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration

Die Grenzwerte der Wasserstoffionenkonzentrationen in Nativ-Gesamtejakulaten liegen weit auseinander. Sie betragen beim Bullen 6,4 - 6,9, beim Schafbock 5,9 - 7,3, beim Ziegenbock 6,2 - 7,5, beim Hengst 7,2 - 7,6 und beim Eber 7,2 - 8,0 (LEIDL, 1983).

Durch Stoffwechselendprodukte der Samenzellen verschiebt sich der pH-Wert bei einer Lagerung des Spermas in den sauren Bereich. Um ein pH-Optimum für Motilität, Stoffwechselaktivität und Überlebensrate über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten, werden den zur Konservierung notwendigen Verdünnern Puffersubstanzen beigegeben.

Der pH-Wert des Ejakulates kann aber auch durch Verunreinigungen der zur Spermagewinnung verwendeten Gerätschaften, wie z.B. Spülmittel- oder Desinfektionsmittelrückstände, beeinflußt werden. Spermien reagieren auf eine Verschiebung aus dem für sie optimalen pH-Bereich ins saure Milieu mit einem progressiven Verlust an Motilität und Stoffwechselaktivität (SCHÜLKE, 1982). Diese Hemmung ist bei Zurückführung in ein neutrales Medium reversibel (LARDY und PHILLIPS, 1943; EMMENS, 1947; NORMAN und JOHNSON, 1958). In Hinsicht auf eine Steigerung der Überlebensrate bei der Lagerung von Bullensperma bei Raumtemperatur, wird in dieser reversiblen Reaktion der Samenzellen ein Vorteil gesehen. (NORMAN und JOHNSON, 1958).

Dagegen tritt in schwach alkalischen Medien bis zu einem Grenzwert von pH 8,5 eine Erhöhung der Motilität und der Stoffwechselaktivität der Spermien auf (SALISBURY und KINNEY, 1957; SALISBURY und VAN DEMARK, 1961). Diese Mobilisierung führt jedoch zur schnelleren Ermüdung der Samenzelle (SMIDT, 1965). In stärker alkalischem Medium findet eine allgemeine Immobilisierung statt. Die Überlebensrate der Spermien ist allerdings höher als in stark sauren Medien (EMMENS, 1947).

Der pH-Bereich, in dem Säugerspermien noch vorwärtsbeweglich sind, erstreckt sich von 5,0 - 8,5 (LARDY und PHILLIPS, 1943; BLACKSHAW und EMMENS, 1951; CHANG und THORNSTEINSSON, 1958). Viele Aussagen liegen über das pH-Optimum in Verdünnern zur Konservierung von Spermien vor. Als Beurteilungskriterien dienen Motilität, Überlebensrate, Stoffwechselaktivität und Fertilitätsparameter. Dagegen sind nur wenige Untersuchungen über pH-abhängige morphologische Veränderungen der Samenzellen durchgeführt worden.

Einen erhöhten Anteil geschwollener Kopfkappen stellten AALSETH und SAAKE (1985) nach der Lagerung von Bullenspermien bei einem pH-Wert von 5,73 - 5,99 fest. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der morphologischen Veränderungen an Spermienköpfen beim Schafbock werden von SCHLEICHER und BRÜCKNER (1973) beschrieben. Im Gegensatz zu Phosphat- oder Zitrat-gepufferten Verdünnern, die nach 24-stündiger Lagerung einen pH-Wert von 5,97 bzw. 6,21 auf-

wiesen, erniedrigte sich im Tris-gepufferten Verdünner der pH selbst nach 72-stündiger Aufbewahrung nur unwesentlich von 6,95 auf 6,93. Membranschädigungen, Quellungen und Auftreibungen des Akrosoms traten in den Verdünnern mit niedrigerem pH-Wert am häufigsten auf.

2.3.3. Veränderung des osmotischen Druckes

Neben der Aufrechterhaltung des für die Samenzellen isotonen osmotischen Druckes in Verdünnerlösungen spielt vor allem die Konzentration einzelner Ionen, wie Natrium, Kalium, Calcium oder auch des häufig eingesetzten Tris(hydroxymethyl)-aminomethan eine entscheidende Rolle für die Integrität und das Überleben der Spermien (MANN, 1964; YASSEN und FOOTE, 1967).

Die Schlußfolgerung, daß hypertone Medien einen weniger schädigenden Einfluß auf Samenzellen haben als hypotone, wurde von BLACKSHAW und EMMENS (1951) aus den Ergebnissen einer Untersuchung über die Auswirkungen von pH-Wert, Elektrolytkonzentration und Osmolalität auf die Motilität von Bullen-, Schaf- und Humanspermien gezogen.

NISHIKAWA (1959) kam zu der Aussage, daß die Empfindlichkeit der Hengstspermien gegenüber hypotonen Verdünnern hinsichtlich der Motilität größer ist als jene von Bullen- und Eberspermien. Er konnte auch aufzeigen, daß der Motilitätsverlust bei Hengst- und

Ziegenbocksperma sowohl im hypotonen als auch im hypertonen Medium rasch erfolgt und über einige Stunden reversibel ist. QUINN und WHITE (1969) beobachteten einen Verlust der Vorwärtsbeweglichkeit von Schafbockspermien in hypotonen Medien nur dann, wenn die Osmolalitätsveränderung schockartig verlief. In hypertonen Lösungen von 320 mosm/kg und 828 mosm/kg wurde nach dem Tiefgefrieren von Schafbocksamen kein Unterschied in der Motilität festgestellt (KOUTSOURIS und VAUPEL, 1973). FISER (1981) findet eine maximale Vorwärtsbeweglichkeit der Schafbockspermien nach dem Tiefgefrieren in einem Verdünner mit 750 mosm/kg.

Beim Eber wurden mit hypotonen (DZIUK, 1958), isotonen (CRABO und GRAHAM, 1972) und hypertonen (HILLMANN und TREU, 1973) Verdünnern und Auftaumedien gute Ergebnisse erzielt. Ein Motilitätsoptimum für Eberspermien fanden STEVERMER et al. (1964) in Verdünnern mit einem Gefrierpunkt zwischen $-0,4^{\circ}\text{C}$ und $-0,55^{\circ}\text{C}$ ($\hat{=}$ 215 und 296 mosm/kg). Sowohl höhere als auch tiefere Osmolalitätswerte verringerten die Motilität.

Die Geschwindigkeit von Hengstspermien in Medien unterschiedlicher Osmolalität wurde von TISCHNER et al. (1980) beurteilt. Maximale Geschwindigkeitswerte traten zwischen 255 und 285 mosm/kg auf, jedoch war hier der Prozentsatz an Spermien mit pathologischen Bewegungen am höchsten. Ein Optimum für den Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen fanden sie bei 338 mosm/kg. Sowohl in mehr hypertonen als auch in hypotonen Medien wurde die Motilität erniedrigt.

Morphologische Veränderungen der Samenzellen beobachtete KÖLLIKER (1856), indem er Ejakulate mit Wasser verdünnte. Er stellte eine vermehrte Anzahl an Spermien mit gekrümmten Schwänzen fest. Diese Aussage wurde von vielen Autoren nicht nur in hypotonen Lösungen (SWANSON und BOYD, 1962; STEINBACH und FOOTE, 1967; QUINN und WHITE, 1969), sondern auch in extrem hypertonen Medien bestätigt (PURSLEY und HERMANN, 1950; NISHIKAWA, 1959).

Nach DREVIUS (1963), der Untersuchungen an Bullenspermien durchführte, beginnen die Veränderungen am Spermien Schwanz mit leichten Biegungen, die dann zu Schwanzkrümmungen führen. Eine Spiralisierung des Spermien Schwanzes konnte er nur in Lösungen mit extrem niedrigem osmotischen Druck nachweisen. Beim Zurückführen der morphologisch veränderten Spermien in die Isotonie war dieser Vorgang reversibel.

Im Gegensatz zu PURSLEY und HERMANN (1950) sowie QUINN und WHITE (1969) konnten BREDDERMANN und FOOTE (1969) eine Schwellung des Spermienkopfes beim Bullen in hypotonen Medien beobachten. Durch Wasserinflux erhöhte sich das Volumen der Samenzelle des Bullen in Verdünnern niedriger Osmolalität bis um das 4-fache, ehe es zu einer Ruptur der Zellmembran kam. Der kritische osmotische Druck lag bei 44 mosm/kg. Die Fläche des Spermiums erschien hierbei jedoch nicht deutlich vergrößert. Die Volumenzunahme war reversibel (DREVIUS und ERIKSSON, 1966; DREVIUS, 1972).

Den maximalen Anteil intakter Akrosome beim Eber beobachtete VEN-GUST (1983) bei 350 mosm/kg. Sowohl in hypo- als auch in hyper-toner Richtung konnte schon nach 15 Min. Lagerung eine Verminderung des Prozentsatzes intakter Akrosome aufgezeigt werden. Beim Bullen wurde eine Schwellung der Kopfkappen in hypotonen Medien nachgewiesen (AALSETH und SAAKE, 1981). Veränderungen der Plasmamembran und Akrosomenalterationen wurden unter nicht isotonen Bedingungen beim Schafbock aufgezeigt (BAUER und LIEBENBERG, 1976; MÜLLER et al., 1977).

3. Untersuchte Tiere und Methoden

3.1. Untersuchte Tiere

Es standen drei Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh im Alter von zwei bis drei Jahren, ein Bergschafbock und zwei Ziegenböcke der Rasse Deutsche Weiße bzw. Deutsche Bunte Edelziege im Alter von zwei Jahren, drei zwei- bis vierjährige Pietraineber und ein vierzehnjähriger Traberhengst zur Verfügung. Das Allgemeinbefinden der Tiere war während der Versuchsdauer ungestört. Inneres und Äußeres Genitale entsprachen der Norm. Über die Fruchtbarkeit lagen keine Daten vor.

3.2. Spermagewinnung

Bei allen Tieren wurde die Spermagewinnung mit der künstlichen Scheide durchgeführt. Als Deckpartner dienten beim Bullen gleichgeschlechtliche, bei Schaf- und Ziegenbock weibliche Tiere. Für die Samengewinnung beim Eber wurde ein Phantom herangezogen. Der Hengst akzeptierte sowohl eine rossige Stute als auch das Phantom. Die Intervalle zwischen den Deseminationen betrugen 2 bis 3 Tage.

3.3. Spermauntersuchung

3.3.1. Untersuchung des nativen Spermas

Unmittelbar nach der Gewinnung der Ejakulate erfolgte die makroskopische Beurteilung von Volumen, Farbe, Konsistenz und Beimengungen. Hengst- und Eberejakulate wurden anschließend filtriert, um Schleim- bzw. Gelbeimengungen und grobe Verunreinigungssteilchen vom Sperma zu trennen. Hierzu dienten handelsübliche Teefilterpapiere.

Die Einzelbewegung der Spermien wurde bei $+38^{\circ}\text{C}$ (Heiztisch) und einer 400-fachen Vergrößerung mit Phasenkontrast geschätzt. Differenziert wurden vorwärtsbewegliche, ortsbewegliche und pathologisch bewegliche Spermien. Die Spermiedichte (Spermien/ μl) wurde in einer Zählkammer nach TÜRK bestimmt.

Die Wasserstoffionenkonzentration wurde mit einem pH-Meter (WTW pH422; Elektrode: Ingold LOT - 405 - M3), die Osmolalität mit einem Halbmikroosmometer (Knauer Type M) bestimmt. Das hierzu benötigte Volumen betrug 0,5 bzw. 0,15 ml.

Der prozentuale Anteil "lebender" Spermien wurde anhand eines Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstriches dargestellt (mod. nach BONNADONNA und OLGIATTI, 1953). Zur Herstellung der Farblösung wurden 2 g Bromphenolblau (Art. 8122, Fa. Merck) und 10 g Nigrosin (Art. 10172, Fa. Merck) in 100 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend wurde diese Lösung kurz erhitzt und nach Abkühlung filtriert (Sartorius Membranfilter SM 125000, Porengröße 12 μm).

Zur Herstellung eines Ausstriches wurde ein Tropfen Sperma (10 μ l), mittels einer Eppendorfpipette, auf einen auf +38° C temperierten Objektträger verbracht. Daneben wurde ein Tropfen Bromphenolblau-Nigrosin-Lösung gesetzt und beide vorsichtig vermischt. Die Größe des Farblösungstropfens wurde dabei so gewählt, daß die Mischung einer Dichte von ca. 100 000 Spermien/ μ l entsprach. Dann wurde ein Deckglas mit einer Kante eingetaucht und der anhängende Tropfen vorsichtig im Winkel von 45° über einen Objektträger geschoben. Nach Lufttrocknung wurden 300 Spermien im Hellfeld bei 1250-facher Vergrößerung (Objektiv 100/Oel x Tubus 1,25 x Okular 10) ausgezählt. Der Anteil ungefärbter Spermien wurde als "lebend" bewertet.

3.3.2. Untersuchungen im verdünnten Sperma

Die Brauchbarkeit von Spermaverdünnern auf der Basis von Tris(hydroxymethyl)-aminomethan ist für alle untersuchten Haustiere beschrieben. (Bulle: DAVIS et al., 1963; STEINBACH und FOOTE, 1964; Schafbock: SALAMON et al., 1977; Ziegenbock: KOLK, 1985; Eber: GOTTARDI et al., 1980; Hengst: PICKETT et al., 1975). In den folgenden Versuchen wurde ein Tris-Zitronensäure Medium ohne weitere Zusätze verwandt. Hierzu wurde mit Tris (Fa. Merck 8382) eine 0,3 molare Lösung hergestellt und diese unter Zugabe von Zitronensäure Monohydrat (Fa. Merck 244) auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Zur Überprüfung dienten hierbei Osmometer und pH-Meter. Die so erreichten Werte betragen 300 mosm/kg und pH 7,0.

Ejakulat : Verdünner von 1 : 10, bei Schaf- und Ziegenbock von 1 : 25, beim Eber von 1 : 2 und beim Hengst von 1 : 1.

Bei allen untersuchten Proben wurden Motilität und Prozentsatz "lebender" Spermien, wie in 3.3.1. beschrieben, bestimmt. Zusätzlich fand die Beurteilung der Spermien nach morphologischen Kriterien statt.

3.4. Die gesetzten Noxen

Es wurden 72 Ejakulate untersucht, um festzustellen, ob und inwieweit die hier beschriebenen Spermaparameter durch Erniedrigung der Temperatur, Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration oder der Osmolalität beeinflusst werden. Die Verteilung der Ejakulate pro Noxe, Individuum und Tierart ist in Tab. 1 dargestellt.

Die Einwirkungszeit der Noxen betrug einheitlich 15 Min.

Tab. 1: Die Verteilung der Ejakulate pro Noxe, Individuum und Tierart

Tierart	Bulle	Schafbock	Ziegenbock	Hengst	Eber
Individuen	3	1	2	1	3
Ejakulate je Individuum	15/3/3	9	9/3	9	15/3/3
davon pro Noxe*	5/1/1	3	3/1	3	5/1/1

*Temperaturerniedrigung; Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration; Veränderung der Osmolalität

3.4.1. Temperaturerniedrigung

Das Nativsperma wurde mit Tris-Medium (siehe 3.3.2.) verdünnt. Von der verdünnten Samenprobe wurde jeweils 1 ml in 4 Reagenzgläser pipettiert (Abb. 1).

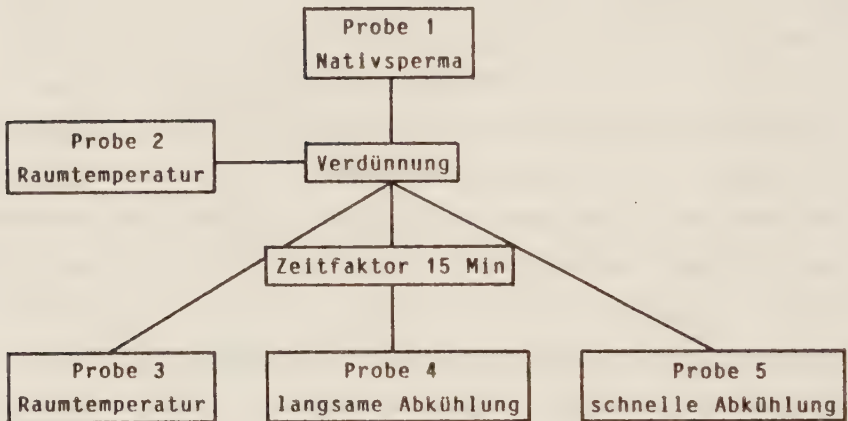


Abb. 1: Modell für die Aufteilung einer Samenprobe

Noxe: Temperaturerniedrigung

Die Ausgangstemperatur der verdünnten Samenproben betrug $+25^{\circ}\text{C}$. Um eine langsame Abkühlung zu erreichen, wurde Probe 4 in einen Kühlschrank gestellt. Die Luftumgebungstemperatur betrug $+5^{\circ}\text{C}$. Es wurde eine annähernd lineare Abkühlgeschwindigkeit von $0,8^{\circ}\text{C/Min.}$ gemessen. Nach 15 Min. erreichte die Probe eine Temperatur von $+12,8^{\circ}\text{C}$ (Abb. 2).

Probe 5 wurde im Reagenzglas in ein Wasserbad von $+5^{\circ}\text{C}$ getaucht. Die Temperatur der verdünnten Samenprobe sank nach 30 Sek. auf $+14,2^{\circ}\text{C}$, nach weiteren 30 Sek. auf $+10,2^{\circ}\text{C}$. In der 2. Minute wurde eine Temperatur von $+7,5^{\circ}\text{C}$, in der 3. Minute von $+6,5^{\circ}\text{C}$ erreicht. Bereits nach 8,5 Min. wurde in der Spermaprobe die Temperatur des umgebenden Wassers von $+5^{\circ}\text{C}$ gemessen (Abb. 3).

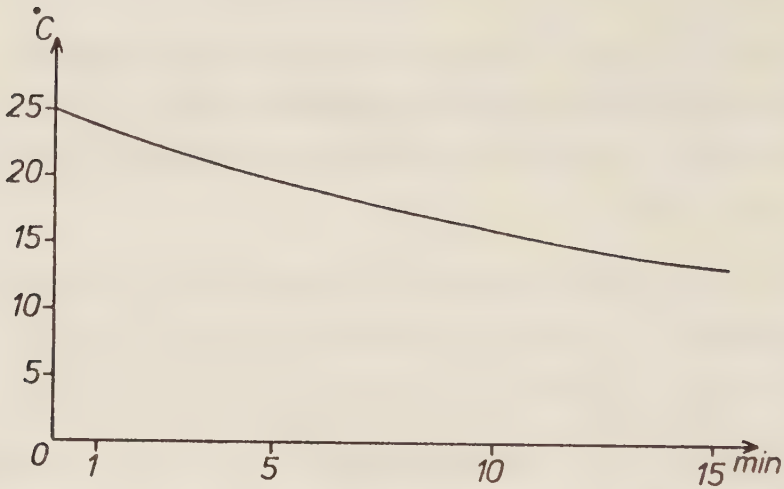


Abb. 2: Abkühlungsdiagramm der verdünnten Samenprobe im Kühlschrank +5° C

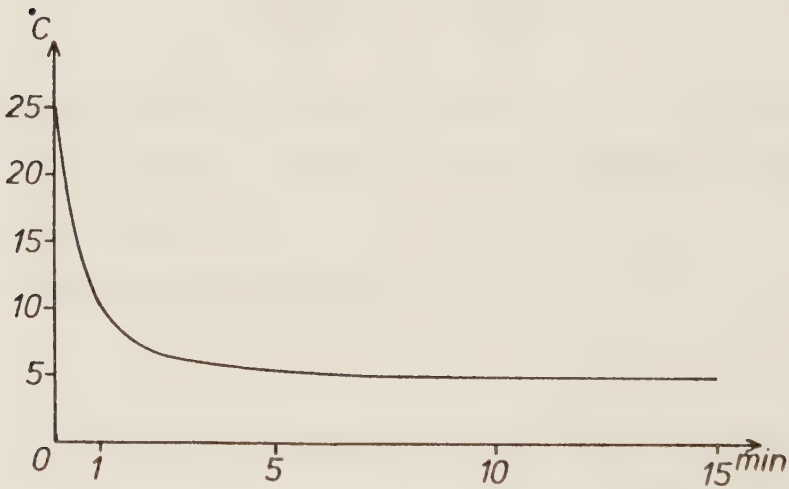


Abb. 3: Abkühlungsdiagramm der verdünnten Samenprobe im Wasserbad +5° C

3.4.2. Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration

Um den pH-Wert zu verändern, wurde der Anteil an Zitronensäure im Tris-Medium (3.3.2.) so variiert, daß 3 Verdünner mit den Werten pH 7, pH 5 und pH 9 zur Verfügung standen.

Die Osmolalität von 300 mosm/kg wurde beibehalten. Der Versuch wurde bei Raumtemperatur (+21° C) durchgeführt (Abb. 4).

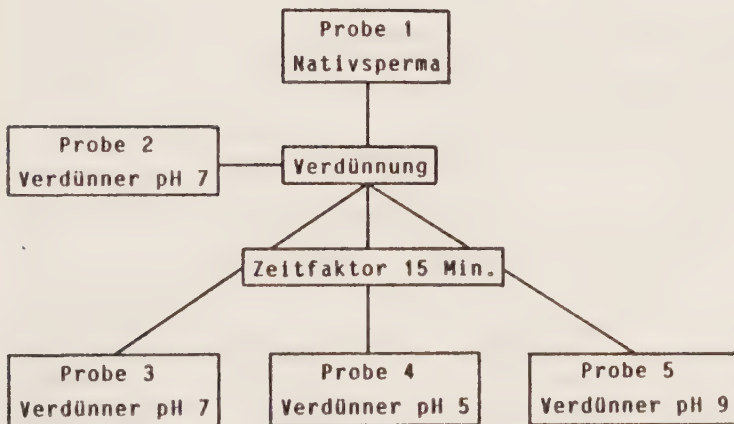


Abb. 4: Modell für die Aufteilung einer Samenprobe

Noxe: Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration

3.4.3. Veränderung der Osmolalität

Um den Einfluß der Osmolalität auf die Spermien zu überprüfen wurden Verdünner mit unterschiedlichem Anteil an Tris(hydroxymethyl)-aminomethan hergestellt. Es standen Verdünner der Osmolalität 300, 150, 500 und 1200 mosm/kg zur Verfügung. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde mit Zitronensäure konstant bei pH 7 gehalten. Der Versuch wurde bei Raumtemperatur (+21° C) durchgeführt (Abb. 5).

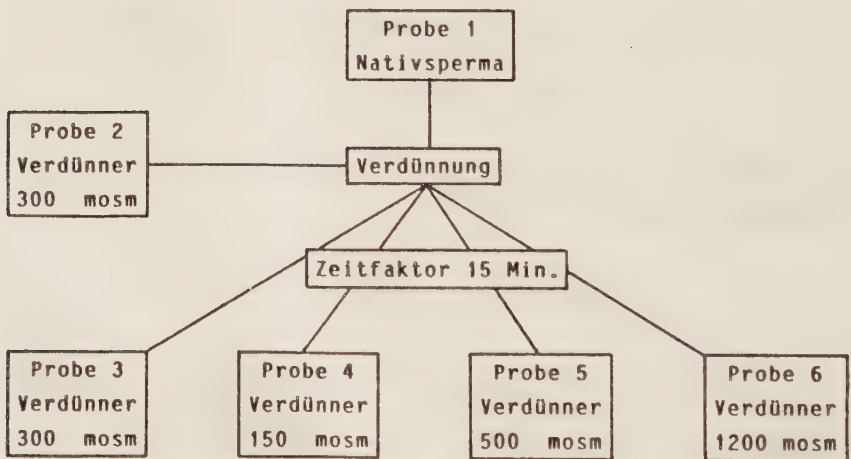


Abb. 5: Modell für die Aufteilung einer Samenprobe

Noxe: Veränderung der Osmolalität

3.5. Fixierung der Spermien zur morphologischen Beurteilung

3.5.1. Färbung nach Fareilly

Das Verfahren wurde von EIBL (1959), ROMMEL (1966) und PAUPLER (1974) beschrieben.

Mit dem verdünnten Sperma wurde ein Nativausstrich angefertigt und nach Lufttrocknung wie folgt weiterbehandelt:

1. Tauchbad für 5 - 10 Sek. in einer Mischung aus physiologischer NaCl-Lösung und Formalin* im Verhältnis 9 : 1
2. Abspülen mit Wasser
3. Tauchbad für 20 Sek. in einer 5 %igen Anilinblau-Lösung (Aqua dest.; Aniline blue, water soluble, Fa. Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, USA)
4. Abspülen mit Wasser
5. Tauchbad für 5 Sek. in einer 0,5 %igen Kristallviolett-Lösung (Aqua dest.; Kristallviolett Art. 1408, Fa. E. Merck, Darmstadt)
6. Abspülen mit Wasser
7. Lufttrocknung

* siehe Seite 28

Die Samenzellen stellen sich bei der Farelly-Färbung scharf konturiert, ohne Hintergrundfärbung dar. Beginnende Akrosomenschädigungen sind durch Aufhellen des akrosomalen Randes erkennbar. Bei stärkerer Schädigung ist die blaßrosa durchscheinende, aufgekräuselte Membran über dem apikalen Rand zu sehen. Gleichzeitig erscheint das Äquatorialesegment im Farbton nicht mehr vom restlichen Kopf abgesetzt, sondern im selben Hellviolett wie die Kopfkappe. Spermien ohne Akrosom sind im gesamten apikalen Teil des Kopfes deutlich aufgehell (Abb. 6, 7).

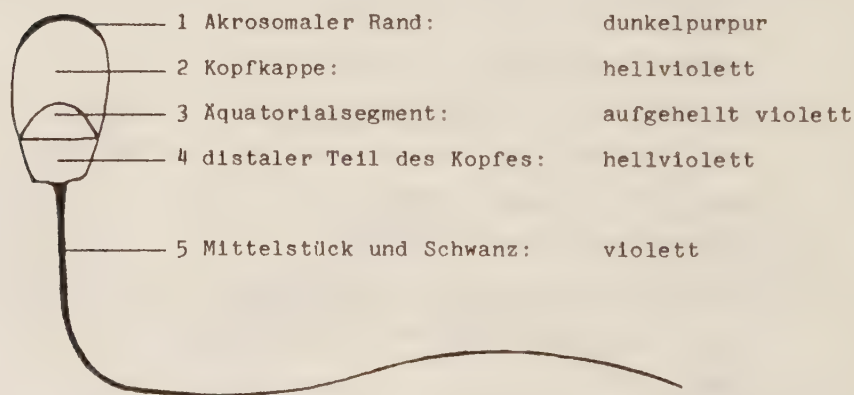
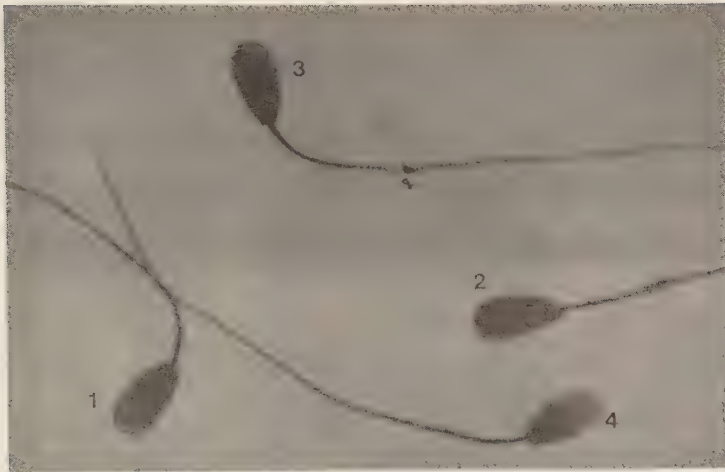
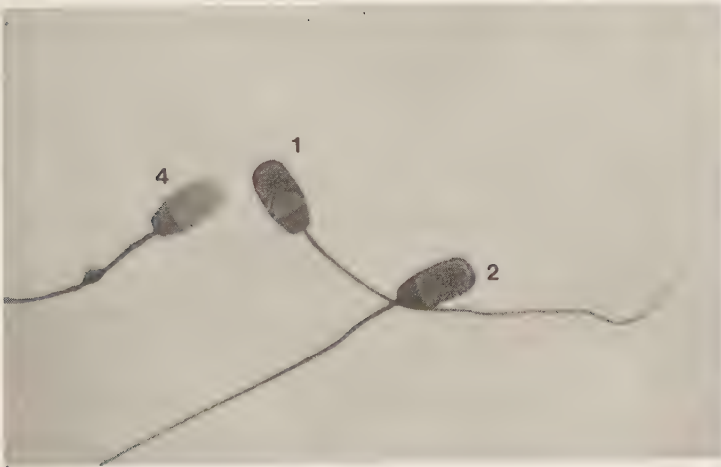


Abb. 6: Die farbliche Darstellung der Spermien (Farelly-Färbung; schematisch)



Bullenspermien



Eberspermien

Abb. 7: Photographische Darstellung der Fareilly-Färbung;
Mikroskopische Gesamtvergrößerung für das Filmnegativ: 400x;
Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2;
1 Akrosom intakt; 2 Akrosom geschwollen; 3 Akrosom in Ablösung
4 ohne Akrosom.

3.5.2. Flüssigfixierung nach Hancock

Als zweite Methode zur Darstellung morphologischer Anomalien wurde die Flüssigfixierung mit Formolsalzlösung (HANCOCK, 1956) nach folgender Rezeptur angewandt:

(1) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	21,68 g
Aqua dest.	ad 500,00 ml

(2) KH_2PO_4	22,25 g
Aqua dest.	ad 500,00 ml

(3) Lösung (1)	200,00 ml
Lösung (2)	80,00 ml

(4) NaCl	9,01 g
Aqua dest.	ad 500,00 ml

(5) Lösung (3)	200,00 ml
Lösung (4)	150,00 ml
Formalin*	62,50 ml
Aqua dest.	ad 500,00 ml

* Formaldehydlösung, säurefrei, 37 %ig (Art. 3999, Fa. E. Merck, Darmstadt)

Der pH-Wert dieser Lösung beträgt $7,0 \pm 0,05$.

40 µl der verdünnten Spermaprobe wurden mit 200 µl dieser Formolsalzlösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) fixiert. Zur mikroskopischen Beurteilung wurde ein Flüssigpräparat hergestellt. Auf einen silikonisierten Objektträger (Tauchbad in einer Silikonlösung Fa. Serva, Heidelberg, Einbrennen des Silikonfilms 1 Stunde bei +100 °C) wurden mit einer Eppendorfpipette 2 µl der Sperma-Formolsalzlösung verbracht und auf diesen Tropfen ein Deckglas aufgelegt. Der Verlauf der Flüssigkeit zwischen Deckglas und Objektträger sollte dabei die Kanten des Deckglases erreichen.

3.6. Lichtmikroskopische Untersuchungsmethoden

Die gefärbten Spermaausstriche wurden im Hellfeld, die flüssigfixierten Präparate sowohl im Phasenkontrast als auch im Differential-Interferenzkontrast morphologisch ausgewertet. Zur Beurteilung stand ein Zeiss Photomikroskop II mit Hellfeld-, Phasenkontrast- und Differential-Interferenzkontrastkondensor zur Verfügung.

Die Gesamtvergrößerung betrug 1250x.

Objektive:

Hellfeld:	Planapo	100/1,32 Oel
Phasenkontrast:	Planapo	100/1,3 Oel
Differential-Interferenzkontrast:	Planachromat	100/1,25 Oel

Okular: 10x

Tubusvergrößerung: 1,25x

Ausgezählt und klassifiziert wurden 300 Spermien pro Präparat. Bei den gefärbten Ausstrichen wurde dabei nur das mittlere Drittel, d.h. die artefaktärmste Zone, berücksichtigt (HARASYMOWYCZ, 1976). Bei flüssigfixierten Proben wurden Spermien der Randzonen nicht bewertet.

3.7. Morphologische Spermaparameter

Die Klassifizierung der morphologischen Formen der Spermien wurde in Anlehnung an LEIDL et al. (1971) vorgenommen (Abb. 8).

Da sekundäre und tertiäre Anomalien aufgrund ihrer Formveränderungen nicht voneinander zu differenzieren sind, wurden tertiäre Anomalien in der Auswertung nicht als eigene Sparte geführt, sondern die Steigerung des Anteils sekundärer Anomalien überprüft.

Spermien der Norm entsprechend

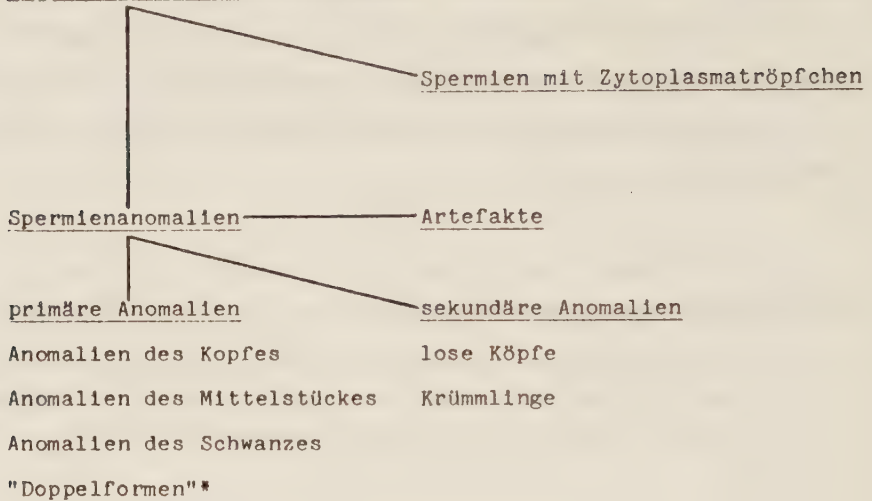


Abb. 8: Schema für die Klassifizierung anomaler Spermien

* Doppelformen anhand lichtoptischer Methoden ermittelt. Das Vorkommen dieser Anomalie ist nur durch elektronenmikroskopische Untersuchungen eindeutig zu belegen.

3.7.1. Schema zur morphologischen Beurteilung

Spermien der Norm entsprechend (Abb. 9)



Spermien mit Zytoplasmatröpfchen (Zyt)



Spermienanomalien:

primäre Anomalien:

Anomalien des Kopfes (Kopf)



Anomalien des Mittelstückes (Mitte)



Anomalien des Schwanzes (Schwanz)



Doppelform (Doppel)



sekundäre Anomalien:

lose Köpfe (Lk)



Krümmlinge:

Einfachkrümmung im Mittelstück (Krm)



Mehrfachkrümmung (Krmf)



Krümmung am Schwanzende (Krschw)



Krümmung mit Aufspaltung (Krbruch)



Artefakte: * (Abb. 15)

Abknickung Hals/Mittelstück (Arthals)



Bruch/Abriß im Schwanz (Artschw)



*Als Artefakte wurden jene Spermienanomalien bezeichnet, deren Formveränderung ursächlich im mechanischen Einfluß der Fixiermethoden lag; z.B. zu hartes Aufsetzen des Deckglases oder ein zu starker Wasserstrom beim Abspülen.



Bulle



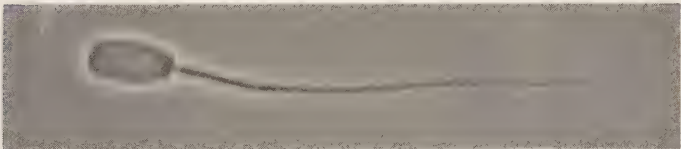
Schafbock



Ziegenbock



Hengst



Eber

Abb. 9: Spermien der Norm entsprechend;

Mikroskopische Gesamtvergrößerung für das Filmnegativ: 400x;

Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

3.7.2. Akrosomenmorphologie

Die lichtoptisch auswertbare Beschaffenheit des Akrosoms und die auftretenden Alterationen wurden von vielen Autoren beschrieben. Zusammenfassend hat dies KLENNER (1975) dargestellt. Ausgezählt wurde in dieser Arbeit der prozentuale Anteil der Akrosome mit normalem apikalen Rand (NAR) in Anlehnung an die Klassifizierung von WEITZE (1977). Pro Präparat wurden 300 Spermien beurteilt. Akrosome mit normalem apikalen Rand wurden als intakte Akrosome bezeichnet. Eine Beurteilung des Akrosoms der Hengstspermien wurde nicht vorgenommen (BAUMGARTL, 1980).

3.7.3. Photographische Darstellung der Akrosomenalterationen

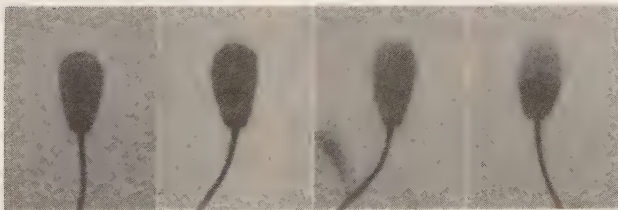
intakt geschwollen in Ablösung ohne Akrosom



Flüssigfixierung/Phasenkontrast



Flüssigfixierung/Differential-Interferenzkontrast



Färbung nach Farelly/Hellfeld

Mikroskopische Gesamtvergrößerung für das Filmnegativ: 400x;
Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

3.8. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde am Leibniz-Rechenzentrum der Bayerischen Akademie der Wissenschaften, München durchgeführt. Angewandt wurden hierbei aus dem Statistikprogrammssystem für die Sozialwissenschaften der F-Test und der t-Test (BEUTEL und SCHUBÖ, 1983). In die Statistik gingen die Prozentzahlen direkt ein.

4. Ergebnisse

4.1. Parameter der Nativ-Ejakulate

Volumen, Dichte, pH-Wert, Osmolalität, Vorwärtsbewegung und Anteil "lebender" Spermien der untersuchten Ejakulate von Bulle, Schafbock, Ziegenbock, Eber und Hengst entsprachen in ihren Werten der physiologischen Bandbreite (Tab. 2 - 4).

Beim Hengst wurden 9 Ejakulate von einem Individuum beurteilt. Im Mittel konnten ein Ejakulatvolumen von 83 ml und eine Dichte von $0,16 \text{ Spermien}/\mu\text{l} \times 10^6$ festgestellt werden. Der pH-Wert lag bei 7,5, die Osmolalität betrug 295 mosm/kg. Der Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen wurde auf 60 % geschätzt und der Prozentsatz "lebender" Spermien betrug 84 %.

Tab. 2: Ejakulatparameter von 3 Bullen ($\bar{x}$ aus n)

Parameter	Bulle 1	Bulle 2	Bulle 3
Ejakulate (n)	15	3	3
Volumen (ml)	5,4	6,0	6,5
Dichte (Spermien/ $\mu\text{l} \times 10^6$)	1,32	0,73	1,28
pH-Wert	6,5	6,6	6,4
Osmolalität (mosm/kg)	294	288	304
Vorwärtsbewegung (%)	82	78	80
ungefärbte Spermien (%)	83	81	85

Tab. 3: Ejakulatparameter von 2 Ziegenböcken und 1 Schafbock ($\bar{x}$ aus n)

Parameter	Ziegenbock 1	Ziegenbock 2	Schafbock 1
Ejakulate (n)	9	3	9
Volumen (ml)	0,87	0,86	1,8
Dichte (Spermien/ $\mu\text{l} \times 10^6$)	5,50	3,29	4,14
pH-Wert	6,8	6,6	6,0
Osmolalität (mosm/kg)	307	314	321
Vorwärtsbewegung (%)	77	80	82
ungefärbte Spermien (%)	79	89	82

Tab. 4: Ejakulatparameter von 3 Ebern ($\bar{x}$ aus n)

Parameter	Eber 1	Eber 2	Eber 3
Ejakulate (n)	15	3	3
Volumen (ml)	190	220	163
Dichte (Spermien/ $\mu\text{l} \times 10^6$)	0,33	0,26	0,39
pH-Wert	7,7	7,7	7,7
Osmolalität (mosm/kg)	307	308	309
Vorwärtsbewegung (%)	82	78	80
ungefärbte Spermien (%)	60	81	66

4.2. Einfluß der Noxe Temperaturerniedrigung auf Motilität, Vitalität und Morphologie

4.2.1. Bulle

Die verdünnten Samenproben (Kontrollwert) wiesen nach 15 Min. Lagerung bei Raumtemperatur ($+21^{\circ}\text{C}$) einen Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien von $69 \pm 6,7\%$ auf. Gegen diesen Wert zeigten sowohl die bei $+5^{\circ}\text{C}$ Lufttemperatur mit $57 \pm 7,0\%$ ($P = 0,006$), als auch die in Eiswasser gehaltenen Proben mit $38 \pm 6,9\%$ ($P < 0,001$), eine signifikante Erniedrigung der Vorwärtsbeweglichkeit.

Der Prozentsatz "lebender" Spermien wurde durch Temperaturerniedrigung ebenfalls deutlich gesenkt. Gegenüber dem Kontrollwert $78 \pm 2,7\%$ traten sowohl bei langsamer Kühlung mit $69 \pm 7,9\%$ ($P = 0,018$), als auch bei schneller Abkühlung mit $55 \pm 7,7\%$ ($P < 0,001$) signifikante Unterschiede auf.

Der prozentuale Anteil an Akrosomen mit normalem apikalen Rand (NAR) erniedrigte sich von $88 \pm 3,7\%$ auf $77 \pm 6,4\%$ ($P = 0,003$) bei langsamer und auf $64 \pm 5,7\%$ ($P < 0,001$) bei schneller Temperatursenkung (Tab. 5).

Die Temperatureinflüsse führten zu einem geringen Anstieg der Spermienanomalien, insbesondere der sekundären Formen ($P > 0,05$; Tab. 6).

Tab. 5. Einfluß langsamer (V_L) und schneller (V_S) Abkühlung verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und "lebender" Spermien sowie den Anteil intakter Akrosome beim Bullen ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 7$ Ejakulaten; 5 von Bulle 1 und je 1 Ejakulat von Bulle 2 und 3)

Parameter	Kontrollwert	Temperaturabfall	
		V_L	V_S
Vorwärtsbewegung (%)	$69,3 \pm 6,72$	$57,1 \pm 6,98^*$	$38,6 \pm 6,90^*$
Ortsbewegung (%)	$3,6 \pm 2,44$	$4,3 \pm 1,89$	$4,3 \pm 3,45$
ungefärbte Spermien (%)	$77,9 \pm 2,69$	$69,3 \pm 7,88^*$	$55,3 \pm 7,66^*$
intakte Akrosome (%)	$88,2 \pm 3,72$	$77,4 \pm 6,41^*$	$64,4 \pm 5,73^*$

* Differenz zum Kontrollwert signifikant (t-Test)

Tab. 6: Einfluß langsamer (V_L) und schneller (V_S) Abkühlung verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ beim Bullen ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 7$ Ejakulaten; 5 von Bulle 1 und je 1 Ejakulat von Bulle 2 und 3)

Art der Anomalien	Kontrollwert	Temperaturabfall	
		V_L	V_S
primäre:	$1,05 \pm 0,39$	$0,98 \pm 0,24$	$1,10 \pm 0,25$
Kopf	$0,58 \pm 0,35$	$0,72 \pm 0,38$	$0,97 \pm 0,33$
Mitte	$0,38 \pm 0,28$	$0,25 \pm 0,27$	$0,12 \pm 0,16$
Schwanz	0	0	0
Doppel	$0,08 \pm 0,22$	0	0
sekundäre:	$1,84 \pm 0,75$	$2,78 \pm 1,86$	$3,15 \pm 1,62$
Lk	$0,67 \pm 0,36$	$0,90 \pm 0,82$	$0,82 \pm 0,62$
Krm	$0,87 \pm 0,56$	$1,44 \pm 0,58$	$1,94 \pm 1,09$
Krmf	$0,08 \pm 0,22$	$0,17 \pm 0,23$	$0,25 \pm 0,32$
Krschw	$0,21 \pm 0,22$	$0,27 \pm 0,47$	$0,12 \pm 0,23$
Krbruch	0	0	0
Artefakte:	$0,08 \pm 0,22$	$0,31 \pm 0,49$	$0,22 \pm 0,36$
Arthals	0	$0,31 \pm 0,49$	$0,22 \pm 0,36$
Artschw	$0,08 \pm 0,22$	0	0
gesamt:	$2,98 \pm 0,65$	$4,08 \pm 1,73$	$4,48 \pm 1,88$
Zyt:	$6,00 \pm 4,05$	$5,97 \pm 4,24$	$5,68 \pm 3,97$

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)

4.2.2. Schafbock

In allen Ejakulaten wurden durch Temperaturerniedrigung die Vorwärtsbewegung der Spermien, der Anteil "lebender" Spermien und die Akrosomenmorphologie beeinflusst. Die Schädigung durch schnelle Abkühlgeschwindigkeit war deutlich stärker ausgeprägt (Tab. 7). Auswirkungen auf die Anzahl der Spermienanomalien zeigten sich nur geringgradig im Anstieg der Krümmlinge (Tab. 8).

Tab. 7: Einfluß langsamer (V_L) und schneller (V_S) Abkühlung verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und "lebender" Spermien sowie den Anteil intakter Akrosome bei 1 Schafbock ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 3$ Ejakulaten)

Parameter	Kontrollwert	Temperaturabfall	
		V_L	V_S
Vorwärtsbewegung (%)	$81,7 \pm 2,88$	$66,7 \pm 5,77$	$16,7 \pm 5,77$
Ortsbewegung (%)	$1,7 \pm 2,88$	$5,0 \pm 5,00$	$5,0 \pm 5,00$
ungefärbte Spermien (%)	$86,2 \pm 2,59$	$79,8 \pm 7,51$	$30,2 \pm 9,88$
intakte Akrosome (%)	$95,5 \pm 1,96$	$88,1 \pm 4,55$	$50,9 \pm 4,70$

Tab. 8: Einfluß langsamer (V_L) und schneller (V_S) Abkühlung verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ bei 1 Schafbock ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 3$ Ejakulaten)

Art der Anomalien	Kontrollwert	Temperaturabfall	
		V_L	V_S
primäre:	$0,50 \pm 0,17$	$0,30 \pm 0,30$	$0,60 \pm 0,30$
Kopf	$0,40 \pm 0,17$	$0,30 \pm 0,30$	$0,40 \pm 0,34$
Mitte	$0,10 \pm 0,17$	0	$0,10 \pm 0,17$
Schwanz	0	0	0
Doppel	0	0	$0,10 \pm 0,17$
sekundäre:	$1,03 \pm 1,02$	$1,83 \pm 2,15$	$1,63 \pm 2,82$
Lk	$0,20 \pm 0,17$	$0,20 \pm 0,17$	$0,20 \pm 0,34$
Krm	$0,63 \pm 0,85$	$1,20 \pm 2,07$	$1,33 \pm 2,30$
Krmf	0	0	0
Krschw	$0,20 \pm 0,17$	$0,33 \pm 0,51$	$0,10 \pm 0,17$
Krbruch	0	0	0
Artefakte:	$0,10 \pm 0,17$	0	0
Arthals	$0,10 \pm 0,17$	0	0
Artschw	0	0	0
gesamt:	$1,63 \pm 1,02$	$2,13 \pm 2,25$	$2,23 \pm 2,57$
Zyt:	$2,96 \pm 2,76$	$1,93 \pm 1,52$	$2,10 \pm 1,85$

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)

4.2.3. Ziegenbock

Durch beide Abkühlgeschwindigkeiten wurde der Anteil an vorwärtsbeweglichen, "lebenden" (ungefärbten) Spermien und intakten Akrosomen erniedrigt. Gegenüber langsamer Abkühlung hatte die schnelle Temperaturerniedrigung auf diese Parameter einen stärker schädigenden Einfluß (Tab. 9).

Veränderungen der Spermienanomalien traten in einer geringen Steigerung sekundärer Formen, insbesondere von losen Köpfen und Krümmlingen auf. Bei schneller Abkühlgeschwindigkeit wirkte sich dies stärker aus (Tab. 10).

Tab. 9: Einfluß langsamer (V_L) und schneller (V_S) Abkühlung verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und "lebender" Spermien sowie den Anteil intakter Akrosome beim Ziegenbock ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 4$ Ejakulaten; 3 von Ziegenbock 1 und 1 Ejakulat von Ziegenbock 2)

Parameter	Kontrollwert	Temperaturabfall	
		V_L	V_S
Vorwärtsbewegung (%)	72,5 $\pm$ 5,00	55,0 $\pm$ 12,91	30,0 $\pm$ 14,14
Ortsbewegung (%)	2,5 $\pm$ 2,88	8,6 $\pm$ 8,53	2,5 $\pm$ 2,88
ungefärbte Spermien (%)	76,8 $\pm$ 8,19	68,3 $\pm$ 13,57	52,7 $\pm$ 12,85
intakte Akrosome (%)	92,1 $\pm$ 1,91	79,9 $\pm$ 4,74	60,6 $\pm$ 2,49

Tab. 10: Einfluß langsamer (V_L) und schneller (V_S) Abkühlung verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ beim Ziegenbock ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 4$ Ejakulaten; 3 von Ziegenbock 1 und 1 Ejakulat von Ziegenbock 2)

Art der Anomalien	Kontrollwert	Temperaturabfall	
		V_L	V_S
primäre:	$0,62 \pm 0,58$	$0,37 \pm 0,28$	$0,45 \pm 0,30$
Kopf	$0,47 \pm 0,42$	$0,30 \pm 0,24$	$0,30 \pm 0,24$
Mitte	$0,15 \pm 0,17$	0	$0,15 \pm 0,17$
Schwanz	0	$0,07 \pm 0,15$	0
Doppel	0	0	0
sekundäre:	$1,35 \pm 0,55$	$1,90 \pm 0,49$	$2,52 \pm 0,99$
Lk	$0,15 \pm 0,17$	$0,37 \pm 0,28$	$0,37 \pm 0,28$
Krm	$0,82 \pm 0,32$	$0,87 \pm 0,34$	$1,70 \pm 1,42$
Krmf	0	$0,07 \pm 0,15$	0
Krschw	$0,37 \pm 0,28$	$0,57 \pm 0,50$	$0,45 \pm 0,30$
Krbruch	0	0	0
Artefakte:	0	$0,07 \pm 0,15$	$0,07 \pm 0,15$
Arthals	0	$0,07 \pm 0,15$	0
Artschw	0	0	$0,07 \pm 0,15$
gesamt:	$1,97 \pm 0,72$	$2,35 \pm 0,46$	$3,05 \pm 1,17$
Zyt:	$3,15 \pm 4,10$	$3,72 \pm 5,73$	$3,15 \pm 4,57$

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)

4.2.4. Hengst

Eine langsame Abkühlung hatte einen geringen schädigenden Einfluß auf den Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien. Die Anzahl "lebender" Spermien wurde hierbei kaum verändert. Im Gegensatz dazu zeigte eine schnelle Temperaturerniedrigung sowohl einen höheren Verlust vorwärtsbeweglicher Spermien als auch eine deutliche Erniedrigung des Anteils lebender Spermien (Tab. 11).

Das vermehrte Vorkommen von Spermienanomalien, 16,3 % im Kontrollwert, 19,9 % bei langsamer und 26,3 % bei schneller Abkühlung, ist auf den höheren Anteil loser Köpfe und Krümmlinge zurückzuführen (Tab. 12).

Tab. 11: Einfluß langsamer (V_L) und schneller (V_S) Abkühlung verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und "lebender" Spermien bei 1 Hengst ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 3$ Ejakulaten)

Parameter	Kontrollwert	Temperaturabfall	
		V_L	V_S
Vorwärtsbewegung (%)	$65,0 \pm 5,00$	$50,0 \pm 0$	$26,7 \pm 5,77$
Ortsbewegung (%)	0	$6,7 \pm 2,88$	$16,7 \pm 11,54$
ungefärbte Spermien (%)	$79,5 \pm 6,46$	$76,3 \pm 4,50$	$54,7 \pm 9,37$

Tab. 12: Einfluß langsamer (V_L) und schneller (V_S) Abkühlung verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ bei 1 Hengst ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 3$ Ejakulaten)

Art der Anomalien	Kontrollwert	Temperaturabfall	
		V_L	V_S
primäre:	$2,70 \pm 1,22$	$2,23 \pm 1,36$	$3,53 \pm 0,83$
Kopf	$1,43 \pm 0,51$	$1,06 \pm 0,40$	$1,20 \pm 0,17$
Mitte	$0,53 \pm 0,92$	$0,76 \pm 1,32$	$1,83 \pm 0,68$
Schwanz	$0,33 \pm 0,57$	$0,10 \pm 0,17$	$0,30 \pm 0,30$
Doppel	$0,40 \pm 0,17$	$0,30 \pm 0,30$	$0,20 \pm 0,17$
sekundäre:	$13,46 \pm 4,18$	$17,70 \pm 5,86$	$22,76 \pm 10,25$
Lk	$1,30 \pm 0,70$	$1,53 \pm 0,50$	$2,20 \pm 1,01$
Krm	$2,06 \pm 0,40$	$4,40 \pm 1,70$	$9,43 \pm 6,27$
Krmf	$0,33 \pm 0,57$	$0,63 \pm 0,57$	$0,96 \pm 1,42$
Krschw	0	$1,06 \pm 1,07$	$0,76 \pm 1,32$
Krbruch	$9,76 \pm 3,90$	$10,06 \pm 3,32$	$9,40 \pm 2,70$
Artefakte:	$0,10 \pm 0,17$	0	0
Arthals	$0,10 \pm 0,17$	0	0
Artschw	0	0	0
gesamt:	$16,26 \pm 2,89$	$19,93 \pm 5,09$	$26,30 \pm 9,45$
Zyt:	$37,63 \pm 15,37$	$34,26 \pm 17,47$	$36,10 \pm 18,90$

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)

4.2.5. Eber

Die Reaktion der Eberspermien auf Temperaturerniedrigung war sehr deutlich ausgeprägt. Schon bei langsamer Abkühlgeschwindigkeit sank die Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen von $71 \pm 6,1 \%$ auf $23 \pm 7,6 \%$ ($P < 0,001$). Nach schneller Temperatursenkung bewegten sich nur noch $5 \pm 2,7 \%$ ($P < 0,001$) der Spermien vorwärts.

Der Anteil "lebender" Spermien erniedrigte sich auf $30 \pm 11,5 \%$ ($P < 0,001$) in den langsam gekühlten und auf $8 \pm 1,5 \%$ ($P < 0,001$) in den schnell gekühlten Proben.

Der Prozentsatz intakter Akrosome betrug in der Kontrollprobe $94 \pm 3,4 \%$. Nach langsamer Abkühlung ergab sich ein Wert von $63 \pm 14,0 \%$ ($P < 0,001$), nach schneller Temperaturerniedrigung von $5 \pm 2,0 \%$ ($P < 0,001$; Tab. 13).

Die Auswertung der Spermienanomalien zeigte wiederum eine leichte Steigerung im Auftreten von Krümmlingen in beiden Fällen der Temperaturerniedrigung. Signifikante Zusammenhänge konnten jedoch nicht aufgezeigt werden (Tab. 14).

Tab. 13: Einfluß langsamer (V_L) und schneller (V_S) Abkühlung verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und "lebender" Spermien sowie den Anteil intakter Akrosome beim Eber ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 7$ Ejakulaten; 5 von Eber 1 und je 1 Ejakulat von Eber 2 und 3)

Parameter	Kontrollwert	Temperaturabfall	
		V_L	V_S
Vorwärtsbewegung (%)	70,7 $\pm$ 6,07	22,9 $\pm$ 7,55*	4,9 $\pm$ 2,67*
Ortsbewegung (%)	3,6 $\pm$ 3,78	6,4 $\pm$ 2,44	5,4 $\pm$ 2,14
ungefärbte Spermien (%)	65,2 $\pm$ 8,04	29,8 $\pm$ 11,49*	8,0 $\pm$ 1,50*
intakte Akrosome (%)	94,2 $\pm$ 3,39	63,3 $\pm$ 14,01*	4,6 $\pm$ 2,05*

* Differenz zum Kontrollwert signifikant (t-Test)

Tab. 14: Einfluß langsamer (V_L) und schneller (V_S) Abkühlung verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ beim Eber ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 7$ Ejakulaten; 5 von Eber 1 und je 1 Ejakulat von Eber 2 und 3)

Art der Anomalien	Kontrollwert	Temperaturabfall	
		V_L	V_S
primäre:	$1,48 \pm 1,15$	$2,02 \pm 0,91$	$2,14 \pm 1,16$
Kopf	$1,40 \pm 0,98$	$1,85 \pm 0,82$	$1,88 \pm 0,91$
Mitte	$0,08 \pm 0,22$	$0,12 \pm 0,16$	$0,17 \pm 0,23$
Schwanz	0	0	$0,04 \pm 0,11$
Doppel	0	$0,04 \pm 0,11$	$0,04 \pm 0,11$
sekundäre:	$2,51 \pm 1,03$	$3,17 \pm 1,42$	$3,48 \pm 1,12$
Lk	$0,45 \pm 0,73$	$0,08 \pm 0,14$	$0,35 \pm 0,35$
Krm	$1,92 \pm 1,30$	$2,87 \pm 1,19$	$2,95 \pm 0,94$
Krmf	$0,04 \pm 0,11$	$0,12 \pm 0,16$	$0,12 \pm 0,23$
Krschw	$0,08 \pm 0,14$	$0,08 \pm 0,14$	$0,04 \pm 0,11$
Krbruch	0	0	0
Artefakte:	0	0	$0,04 \pm 0,11$
Arthals	0	0	$0,04 \pm 0,11$
Artschw	0	0	0
gesamt:	$4,00 \pm 1,92$	$5,20 \pm 2,23$	$5,67 \pm 2,13$
Zyt:	$5,15 \pm 4,81$	$4,88 \pm 3,87$	$4,81 \pm 4,16$

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)

4.2.6. Tierartlicher Vergleich

Für die vergleichende Darstellung der untersuchten Spezies wurden die entsprechenden Kontrollwerte gleich 100 % gesetzt.

Insgesamt sind die durch schnelle Abkühlung ausgelösten Veränderungen gravierender als jene, die bei langsamer Abkühlung auftreten.

Beide Verfahren hatten beim Eber den deutlichsten Einfluß. Gegenüber dem Kontrollwert waren nur noch 32 % der Spermien dieser Spezies nach langsamer und 7 % nach schneller Temperaturerniedrigung vorwärtsbeweglich. Im Gegensatz dazu führte bei den anderen untersuchten Tierarten nur die schnelle Abkühlgeschwindigkeit zu einer deutlichen Erniedrigung der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien. Beim Schafbock war dies am ausgeprägtesten.

Der Anteil "lebender" (ungefärbter) Spermien sank bei Bulle, Schafbock, Ziegenbock und Hengst nach langsamer Abkühlung auf ca. 90 % des Kontrollwertes, nach schneller Abkühlung auf ca. 70 %, mit Ausnahme des Schafbocks, der hier 35 % aufwies. Beim Eber konnten nach langsamer Temperaturerniedrigung noch 46 % und nach schneller 12 % "lebende" Spermien in bezug auf den Ausgangswert ermittelt werden.

Der Anteil intakter Akrosome sank bei Bulle, Schaf- und Ziegenbock nach langsamer Kühlung auf ca. 90 %, beim Eber jedoch auf

67 %. Nach schneller Abkühlung der verdünnten Samenproben wiesen die untersuchten Spezies noch folgende Prozentsätze des Ausgangswertes auf (Tab. 15): Bulle 73 %, Ziegenbock 66 %, Schafbock 53 % und Eber noch 5 %.

Bei allen untersuchten Tierarten zeigten die gekühlten Proben einen geringgradig höheren Anteil an Spermienanomalien, insbesondere an Krümmlingen. Beim Hengst erschien dies am deutlichsten.

Tab. 15: Relative Abweichungen des Prozentsatzes an vorwärtsbeweglichen und "lebenden" Spermien sowie intakten Akrosomen als Reaktion auf langsame (V_L) und schnelle (V_S) Abkühlung verdünnter Samenproben (Ausgangswerte 100 %)

Tierart Ejakulate	Vorwärtsbewegung		ungefärbte Spermien		intakte Akrosome	
	V_L	V_S	V_L	V_S	V_L	V_S
Bulle n = 7	82,5	55,7	89,0	71,0	87,8	73,1
Schafbock n = 3	81,6	20,4	92,6	35,0	92,2	53,2
Ziegenbock n = 4	75,9	41,4	88,9	68,6	86,7	65,8
Hengst n = 3	77,0	41,0	96,0	68,8	-	-
Eber n = 7	32,3	6,9	45,6	12,3	67,3	4,9

4.3. Einfluß der Noxe Wasserstoffionenkonzentration auf Motilität, Vitalität und Morphologie

4.3.1. Bulle

In der Kontrollprobe (Verdünner pH 7) betrug der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien $74 \pm 2,4 \%$. Die durch den Verdünner pH 9 provozierte Erniedrigung der Vorwärtsbeweglichkeit auf $16 \pm 7,9 \%$ ($P < 0,001$) war bedeutend größer als durch den Verdünner pH 5 auf $49 \pm 1,9 \%$ ($P < 0,001$). Gleichzeitig erhöhte sich die Ortsbeweglichkeit der Samenzellen im sauren Medium auf $11 \pm 4,5 \%$ ($P = 0,008$) und im alkalischen auf $36 \pm 11,3 \%$ ($P < 0,001$).

Eine Beeinflussung des Prozentsatzes "lebender" Spermien war zwar auch im Verdünner pH 5 mit $80 \pm 4,5 \%$ ($P = 0,008$) gegenüber dem Kontrollwert von $87 \pm 2,7 \%$ gegeben, wurde jedoch im alkalischen Milieu mit $53 \pm 13,1 \%$ ($P < 0,001$) wesentlich deutlicher.

Eine Akrosomenschädigung konnte sowohl im sauren wie auch im alkalischen Milieu aufgezeigt werden. Der prozentuale Anteil intakter Akrosome erniedrigte sich gegenüber dem Kontrollwert von $86 \pm 3,3 \%$ im Verdünner pH 5 auf $80 \pm 4,2 \%$ ($P = 0,012$) und im Verdünner pH 9 auf $77 \pm 3,2 \%$ ($P < 0,001$; Tab. 16).

Durch den Einfluß der unterschiedlichen Wasserstoffionenkonzentration im Verdünner ließ sich der Anteil der Spermienanomalien nicht verändern (Tab. 17).

Tab. 16: Einfluß unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentrationen verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und "lebender" Spermien sowie den Anteil intakter Akrosome beim Bullen ($\bar{X} \pm s$ aus $n = 7$ Ejakulaten; 5 von Bulle 1 und je 1 Ejakulat von Bulle 2 und 3)

Parameter	Verdüner ⁺ pH 7	Verdüner pH 5	Verdüner pH 9
Vorwärtsbewegung (%)	73,6 $\pm$ 2,44	49,3 $\pm$ 10,17*	15,7 $\pm$ 7,86*
Ortsbewegung (%)	4,3 $\pm$ 1,89	10,7 $\pm$ 4,49*	35,7 $\pm$ 11,33*
ungefärbte Spermien (%)	86,9 $\pm$ 2,70	80,4 $\pm$ 4,51*	53,2 $\pm$ 13,14*
intakte Akrosome (%)	85,9 $\pm$ 3,31	79,8 $\pm$ 4,18*	76,8 $\pm$ 3,18*

* Differenz zum Kontrollwert signifikant (t-Test)

+ Kontrollwert

Tab. 17: Einfluß unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentrationen verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ beim Bullen ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 7$ Ejakulaten; 5 von Bulle 1 und je 1 Ejakulat von Bulle 2 und 3)

Art der Anomalien	Verdünner ⁺⁺ pH 7	Verdünner pH 5	Verdünner pH 9
primäre:	0,84 $\pm$ 0,50	0,81 $\pm$ 0,28	0,80 $\pm$ 0,66
Kopf	0,54 $\pm$ 0,37	0,55 $\pm$ 0,46	0,40 $\pm$ 0,46
Mitte	0,25 $\pm$ 0,27	0,25 $\pm$ 0,27	0,40 $\pm$ 0,36
Schwanz	0	0	0
Doppel	0,04 $\pm$ 0,11	0	0
sekundäre:	2,05 $\pm$ 1,19	2,45 $\pm$ 1,21	2,15 $\pm$ 1,02
Lk	0,47 $\pm$ 0,23	0,44 $\pm$ 0,41	0,45 $\pm$ 0,42
Krm	1,05 $\pm$ 0,82	1,44 $\pm$ 0,73	1,42 $\pm$ 0,46
Krmf	0,31 $\pm$ 0,46	0,31 $\pm$ 0,37	0,04 $\pm$ 0,11
Krschw	0,17 $\pm$ 0,23	0,17 $\pm$ 0,23	0,22 $\pm$ 0,36
Krbruch	0,04 $\pm$ 0,11	0,08 $\pm$ 0,14	0
Artefakte:	0	0	0
Arthals	0	0	0
Artschw	0	0	0
gesamt:	2,90 $\pm$ 1,38	3,27 $\pm$ 1,10	2,95 $\pm$ 1,55
Zyt:	4,10 $\pm$ 0,95	4,25 $\pm$ 0,96	4,08 $\pm$ 1,04

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)
⁺⁺ Kontrollwert

4.3.2. Schafbock

Von den untersuchten Parametern wurde der prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien am auffälligsten betroffen. Im alkalischen Milieu war die Immobilisierung bedeutend ausgeprägter als im sauren. Ortsbewegliche Spermien traten im Verdünner pH 5 vermehrt auf. Der Anteil "lebender" Spermien sank im sauren Bereich kaum, im alkalischen dagegen deutlich. Die Schädigung intakter Akrosome war sowohl im Verdünner pH 5 wie auch, in etwas vermehrtem Maße, im Verdünner pH 9 erkennbar (Tab 18).

Eine Beeinflussung der Anzahl der Spermienanomalien ließ sich nicht aufzeigen (Tab. 19).

Tab. 18: Einfluß unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentrationen verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und "lebender" Spermien sowie den Anteil intakter Akrosome bei 1 Schafbock ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 3$ Ejakulaten)

Parameter	Verdünner ⁺ pH 7	Verdünner pH 5	Verdünner pH 9
Vorwärtsbewegung (%)	78,3 $\pm$ 7,63	46,7 $\pm$ 5,77	4,0 $\pm$ 1,73
Ortsbewegung (%)	1,7 $\pm$ 2,88	16,7 $\pm$ 5,77	5,0 $\pm$ 0
ungefärbte Spermien (%)	86,7 $\pm$ 1,15	85,9 $\pm$ 6,03	78,7 $\pm$ 1,50
intakte Akrosome (%)	93,2 $\pm$ 3,66	89,1 $\pm$ 3,23	82,5 $\pm$ 7,17

⁺ Kontrollwert

Tab. 19: Einfluß unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentrationen verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ bei 1 Schafbock ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 3$ Ejakulaten)

Art der Anomalien	Verdüner ⁺⁺ pH 7	Verdüner pH 5	Verdüner pH 9
primäre:	$0,20 \pm 0,34$	$0,40 \pm 0,17$	$0,53 \pm 0,40$
Kopf	$0,20 \pm 0,34$	$0,40 \pm 0,17$	$0,43 \pm 0,51$
Mitte	0	0	$0,10 \pm 0,17$
Schwanz	0	0	0
Doppel	0	0	0
sekundäre:	$1,13 \pm 0,40$	$1,16 \pm 1,76$	$1,66 \pm 1,59$
Lk	0	$0,20 \pm 0,17$	$0,30 \pm 0,30$
Krm	$0,73 \pm 0,51$	$0,53 \pm 0,93$	$1,06 \pm 1,07$
Krmf	$0,10 \pm 0,17$	0	0
Krschw	$0,30 \pm 0$	$0,43 \pm 0,75$	$0,20 \pm 0,34$
Krbruch	0	0	$0,10 \pm 0,17$
Artefakte:	0	0	0
Arthals	0	0	0
Artschw	0	0	0
gesamt:	$1,33 \pm 0,75$	$1,56 \pm 1,70$	$2,20 \pm 1,99$
Zyt:	$2,20 \pm 0,72$	$2,86 \pm 0,98$	$2,40 \pm 1,05$

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)

⁺⁺ Kontrollwert

4.3.3. Ziegenbock

Die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien sank im Verdünner pH 5 auf unter 20 %; bei pH 9 bewegten sich nur noch vereinzelte Spermien vorwärts, während der Anteil ortsbeweglicher Samenzellen in beiden Fällen drastisch anstieg. Die Anzahl "lebender" Spermien wurde durch die unterschiedlichen pH-Werte nicht beeinflusst. Auch die intakten Akrosome wurden im Verdünner pH 9 nur geringgradig geschädigt (Tab. 20).

Eine Erhöhung des Anteils der Spermienanomalien war nicht festzustellen (Tab. 21).

Tab. 20: Einfluß unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentrationen verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und "lebender" Spermien sowie den Anteil intakter Akrosome beim Ziegenbock ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 4$ Ejakulaten; 3 von Ziegenbock 1 und 1° Ejakulat von Ziegenbock 2)

Parameter	Verdünner ⁺ pH 7	Verdünner pH 5	Verdünner pH 9
Vorwärtsbewegung (%)	70,0 $\pm$ 9,12	17,5 $\pm$ 5,00	6,3 $\pm$ 2,50
Ortsbewegung (%)	5,0 $\pm$ 4,08	40,0 $\pm$ 11,54	32,5 $\pm$ 9,57
ungefärbte Spermien (%)	82,6 $\pm$ 9,53	82,6 $\pm$ 7,57	82,7 $\pm$ 3,03
intakte Akrosome (%)	92,2 $\pm$ 3,49	91,1 $\pm$ 3,77	85,3 $\pm$ 4,06

⁺ Kontrollwert

Tab. 21: Einfluß unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentrationen verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ beim Ziegenbock ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 4$ Ejakulaten; 3 von Ziegenbock 1 und 1 Ejakulat von Ziegenbock 2)

Art der Anomalien	Verdünner ⁺⁺ pH 7	Verdünner pH 5	Verdünner pH 9
primäre:	0,52 $\pm$ 0,28	0,85 $\pm$ 0,55	0,60 $\pm$ 0,24
Kopf	0,45 $\pm$ 0,17	0,55 $\pm$ 0,41	0,37 $\pm$ 0,15
Mitte	0,07 $\pm$ 0,15	0,22 $\pm$ 0,28	0,22 $\pm$ 0,28
Schwanz	0	0,07 $\pm$ 0,15	0
Doppel	0	0	0
sekundäre:	4,00 $\pm$ 2,40	2,12 $\pm$ 1,49	3,40 $\pm$ 3,09
Lk	0,72 $\pm$ 0,56	0,47 $\pm$ 0,42	1,15 $\pm$ 0,87
Krm	2,00 $\pm$ 1,41	1,05 $\pm$ 0,75	1,62 $\pm$ 2,00
Krmf	0	0	0,07 $\pm$ 0,15
Krschw	0,95 $\pm$ 0,40	0,45 $\pm$ 0,17	0,22 $\pm$ 0,28
Krbruch	0,32 $\pm$ 0,65	0,15 $\pm$ 0,30	0,32 $\pm$ 0,65
Artefakte:	0,22 $\pm$ 0,28	0	0
Arthals	0,07 $\pm$ 0,15	0	0
Artschw	0,15 $\pm$ 0,30	0	0
gesamt:	4,75 $\pm$ 2,54	2,97 $\pm$ 2,04	4,00 $\pm$ 3,27
Zyt:	2,05 $\pm$ 0,33	2,05 $\pm$ 0,41	1,80 $\pm$ 0,23

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)
⁺⁺ Kontrollwert

4.3.4. Hengst

Beim Hengst bewegten sich sowohl im sauren Verdünner pH 5 als auch im alkalischen pH 9 nur noch eine geringe Zahl der Spermien vorwärts. Die Erhöhung des Anteils ortsbeweglicher Samenzellen war im alkalischen Medium viel deutlicher. Der Prozentsatz "lebender" Spermien erniedrigte sich im sauren Milieu stärker als im alkalischen (Tab. 22).

Auch bei dieser Spezies wurde durch Veränderung der pH-Werte der Verdünner kein vermehrter Anteil an Spermienanomalien hervorgerufen (Tab. 23).

Tab. 22: Einfluß unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentrationen verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und "lebender" Spermien bei 1 Hengst ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 3$ Ejakulaten)

Parameter	Verdünner ⁺ pH 7	Verdünner pH 5	Verdünner pH 9
Vorwärtsbewegung (%)	43,3 $\pm$ 5,77	6,7 $\pm$ 2,88	6,7 $\pm$ 2,88
Ortsbewegung (%)	13,3 $\pm$ 5,77	11,7 $\pm$ 7,63	43,3 $\pm$ 5,77
ungefärbte Spermien (%)	80,3 $\pm$ 1,73	62,6 $\pm$ 4,50	72,4 $\pm$ 5,98

⁺ Kontrollwert

o

Tab. 23: Einfluß unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentrationen verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ bei einem Hengst ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 3$ Ejakulaten)

Art der Anomalien	Verdüner ⁺⁺ pH 7	Verdüner pH 5	Verdüner pH 9
primäre:	2,13 $\pm$ 2,07	2,40 $\pm$ 1,15	2,67 $\pm$ 1,80
Kopf	1,20 $\pm$ 0,72	1,00 $\pm$ 0	0,96 $\pm$ 0,57
Mitte	0,30 $\pm$ 0,30	0,96 $\pm$ 0,85	0,96 $\pm$ 0,35
Schwanz	0,43 $\pm$ 0,75	0,43 $\pm$ 0,51	0,53 $\pm$ 0,68
Doppel	0,20 $\pm$ 0,34	0	0,30 $\pm$ 0,30
sekundäre:	13,63 $\pm$ 2,58	12,93 $\pm$ 3,51	16,63 $\pm$ 5,31
Lk	0,53 $\pm$ 0,68	0,63 $\pm$ 0,35	0,53 $\pm$ 0,68
Krm	4,86 $\pm$ 0,23	3,43 $\pm$ 0,51	4,86 $\pm$ 1,91
Krmf	0,30 $\pm$ 0,30	0	0,10 $\pm$ 0,17
Krschw	0,53 $\pm$ 0,50	0,10 $\pm$ 0,17	1,30 $\pm$ 1,48
Krbruch	7,40 $\pm$ 2,55	8,76 $\pm$ 3,28	9,83 $\pm$ 3,21
Artefakte:	0,10 $\pm$ 0,17	0,20 $\pm$ 0,17	0
Arthals	0	0	0
Artschw	0,10 $\pm$ 0,17	0,20 $\pm$ 0,17	0
gesamt:	15,86 $\pm$ 0,35	15,53 $\pm$ 2,57	19,40 $\pm$ 4,43
Zyt:	27,40 $\pm$ 5,91	26,53 $\pm$ 3,93	26,20 $\pm$ 5,43

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)
⁺⁺ Kontrollwert

4.3.5. Eber

Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien wies in der Kontrollprobe $71 \pm 10,2 \%$ auf. Im alkalischen Bereich sank dieser Wert auf $54 \pm 9,6 \%$ ($P = 0,009$). Um vieles deutlicher war die Reaktion im sauren Verdünner pH 5. Nur noch $7 \pm 2,7 \%$ ($P < 0,001$) der Samenzellen zeigten Vorwärtsbeweglichkeit. Der Anteil ortsbeweglicher Spermien erhöhte sich im Verdünner pH 9 von $7 \pm 6,4 \%$ auf $14 \pm 9,0 \%$ und im Verdünner pH 5 auf $24 \pm 9,8 \%$ ($P = 0,003$).

Die Auszählung der "lebenden" Spermien zeigte in beiden Fällen keine Erniedrigungen im Vergleich zum Kontrollwert.

Akrosome wurden im sauren wie im alkalischen Milieu geschädigt. Von $92 \pm 1,8 \%$ sank der Anteil intakter Akrosome auf $87 \pm 3,6 \%$ ($P = 0,005$) im Medium pH 5 und auf $87 \pm 3,8 \%$ ($P = 0,012$) bei pH 9 (Tab. 24).

Bei der Auswertung der Spermienanomalien konnten in beiden Fällen keine signifikanten Unterschiede zum Kontrollwert erkannt werden (Tab. 25).

Tab. 24: Einfluß unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentrationen verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und "lebender" Spermien sowie den Anteil intakter Akrosome beim Eber ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 7$ Ejakulaten; 5 von Eber 1 und je 1 Ejakulat von Eber 2 und 3)

Parameter	Verdünnern ⁺ pH 7	Verdünnern pH 5	Verdünnern pH 9
Vorwärtsbewegung (%)	70,7 $\pm$ 10,17	7,1 $\pm$ 2,67*	54,3 $\pm$ 9,75*
Ortsbewegung (%)	7,1 $\pm$ 6,36	24,3 $\pm$ 9,75*	13,6 $\pm$ 8,52
ungefärbte Spermien (%)	61,3 $\pm$ 9,78	63,8 $\pm$ 13,28	72,4 $\pm$ 13,64
intakte Akrosome (%)	92,2 $\pm$ 1,79	86,8 $\pm$ 3,51*	87,3 $\pm$ 3,78*

* Differenz zum Kontrollwert signifikant (t-Test)

+ Kontrollwert

Tab. 25: Einfluß unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentrationen verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ beim Eber ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 7$ Ejakulaten; 5 von Eber 1 und je 1 Ejakulat von Eber 2 und 3)

Art der Anomalien	Verdünnern ⁺⁺ pH 7	Verdünnern pH 5	Verdünnern pH 9
primäre:	1,42 $\pm$ 0,56	0,98 $\pm$ 0,60	1,35 $\pm$ 0,61
Kopf	1,25 $\pm$ 0,45	0,81 $\pm$ 0,67	1,14 $\pm$ 0,55
Mitte	0,12 $\pm$ 0,16	0,17 $\pm$ 0,16	0,17 $\pm$ 0,16
Schwanz	0,04 $\pm$ 0,11	0	0
Doppel	0	0	0,04 $\pm$ 0,11
sekundäre:	1,92 $\pm$ 1,15	2,67 $\pm$ 1,62	2,51 $\pm$ 1,70
Lk	0,17 $\pm$ 0,13	0,31 $\pm$ 0,37	0,21 $\pm$ 0,14
Krm	1,54 $\pm$ 1,15	1,95 $\pm$ 1,73	2,11 $\pm$ 1,59
Krmf	0,04 $\pm$ 0,11	0,18 $\pm$ 0,37	0,04 $\pm$ 0,11
Krschw	0,17 $\pm$ 0,23	0,21 $\pm$ 0,28	0,04 $\pm$ 0,11
Krbruch	0	0	0
Artefakte:	0	0,04 $\pm$ 0,11	0
Arthals	0	0	0
Artschw	0	0,04 $\pm$ 0,11	0
gesamt:	3,35 $\pm$ 0,99	3,70 $\pm$ 1,56	3,77 $\pm$ 1,63
Zyt:	12,54 $\pm$ 18,67	12,61 $\pm$ 19,80	12,15 $\pm$ 17,91

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)
⁺⁺ Kontrollwert

4.3.6. Tierartlicher Vergleich

Der Verdünner der Kontrollprobe war auf den pH-Wert 7 eingestellt. Um den Vergleich zwischen den untersuchten Tierarten zu ermöglichen, wurden die Ergebnisse dieser Kontrollprobe gleich 100 % gesetzt. Bei allen Spezies war von den untersuchten Parametern der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf den Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien am deutlichsten. Im Verdünner pH 5 zeigten die Spezies Bulle mit 67 %, Schafbock mit 60 % und Ziegenbock mit 25 % eine geringere Auswirkung auf den Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen als im Verdünner pH 9 mit 21 % beim Bullen, 5 % beim Schaf- und 9 % beim Ziegenbock. Die Vorwärtsbeweglichkeit der Hengstspermien erniedrigte sich sowohl im sauren, als auch im alkalischen Milieu auf 15 %. Im Gegensatz dazu zeigte der Eber eine viel deutlichere Erniedrigung der Vorwärtsbeweglichkeit im sauren Bereich. Nur 10 % der Eberspermien waren bei pH 5 vorwärtsbeweglich, dagegen 77 % bei pH 9.

Der Anteil "lebender" (ungefärbter) Spermien wurde beim Bullen im alkalischen Medium am deutlichsten auf 61 % gesenkt. Hengstspermien reagierten dagegen im alkalischen Bereich empfindlicher als im saueren. Ziegenbock und Eberspermien ließen durch die Verschiebung des pH-Wertes keine Veränderung des Prozentsatzes "lebender" Spermien erkennen.

Die Schädigung des Akrosoms war bei den Wiederkäuern im alkalischen Medium etwas stärker ausgeprägt. Beim Eber konnten sowohl im sauren als auch im alkalischen Verdünner 94 % intakte Akrosome des Kontrollwertes nachgewiesen werden (Tab. 26).

Eine durch diese Noxe hervorgerufene Steigerung des Anteils an Spermienanomalien ließ sich bei keinem der untersuchten Tiere feststellen.

Tab. 26: Relative Abweichungen des Prozentsatzes an vorwärtsbeweglichen und "lebenden" Spermien sowie intakten Akrosomen als Reaktion auf unterschiedliche Wasserstoffionenkonzentrationen verdünnter Samenproben (Ausgangswerte 100 %)

Tierart Ejakulate	Vorwärtsbewegung		ungefärbte Spermien		intakte Akrosome	
	pH 5	pH 9	pH 5	pH 9	pH 5	pH 9
Bulle n = 7	67,0	21,4	92,5	61,2	92,9	89,4
Schafbock n = 3	59,6	5,1	99,1	90,9	95,6	88,6
Ziegenbock n = 4	25,0	8,9	99,9	100,0	98,7	92,5
Hengst n = 3	15,4	15,4	78,0	90,2	-	-
Eber n = 7	10,1	76,8	104,1	118,1	94,1	94,6

4.4. Einfluß der Noxe Osmolalität auf Motilität, Vitalität und Morphologie

4.4.1. Bulle

In der Kontrollprobe mit einem auf 300 mosm/kg eingestellten Verdünner waren $81 \pm 3,5 \%$ der Spermien vorwärtsbeweglich. Im hypotonen Medium von 150 mosm/kg erniedrigte sich die Vorwärtsbeweglichkeit auf $16 \pm 5,3 \%$ ($P < 0,001$). Die hypertone Probe mit 500 mosm/kg zeigte nur noch vereinzelt vorwärtsbewegliche Samenzellen, $3 \pm 1,6 \%$ ($P < 0,001$) und bei 1200 mosm/kg waren alle Spermien bewegungslos. Dagegen erniedrigte sich der Anteil "lebender" Spermien im Verdünner mit 150 mosm/kg auf $65 \pm 11,1 \%$ ($P = 0,002$) deutlicher gegenüber dem Kontrollwert von $85 \pm 2,4 \%$, als bei 500 mosm/kg auf $80 \pm 8,0 \%$. Im extrem hypertonen Bereich von 1200 mosm/kg konnten noch $49 \pm 18,7 \%$ ($P < 0,001$) "lebende" Spermien ermittelt werden.

Der Prozentsatz intakter Akrosome sank bei 150 mosm/kg auf $85 \pm 4,4 \%$ ($P = 0,008$) bei 1200 mosm/kg auf $61 \pm 8,7 \%$ ($P < 0,001$) gegenüber dem Ausgangswert von $91 \pm 2,4 \%$. Die Probe bei 500 mosm/kg war mit dem Wert $89 \pm 2,0 \%$ nicht signifikant erniedrigt (Tab. 27).

Eine Abhängigkeit zwischen dem osmotischen Druck des Verdünners und der dadurch hervorgerufenen Steigerung der Spermienanomalien

war eindeutig erkennbar. Im Vordergrund stand beim Bullen das vermehrte Auftreten von Krümmungen am Schwanzende des Spermiums (Krschw). Hier war gegenüber dem Kontrollwert von 0,17 % das extreme Ansteigen auf 34,6 % ($P < 0,001$) im hypotonen Verdünner mit 150 mosm/kg zu beobachten. Wesentlich weniger erhöhte sich dieser Parameter im hypertonen Bereich bei 500 mosm/kg auf 2,35 % ($P = 0,052$) und bei 1200 mosm/kg auf 3,91 % ($P = 0,008$). Ein ähnlich starker Effekt zeigte sich an Spermien mit Einfachkrümmungen im Mittelstück (Krm). Hier wurde der Ausgangswert von 1,75 % auf 21,8 % ($P < 0,001$) im Verdünner 150 mosm/kg erhöht. Insgesamt waren es ausschließlich sogenannte sekundäre Anomalien, die durch Veränderungen der Osmolalität hervorgerufen wurden (Tab. 28; Abb. 10).

Tab. 27: Einfluß unterschiedlicher Osmolalitäten verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher, Spermien mit pathologischer Bewegung und "lebender" Spermien sowie den Anteil intakter Akrosome beim Bullen ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 7$ Ejakulaten; 5 von Bulle 1 und je 1 Ejakulat von Bulle 2 und 3)

Parameter	Verdünner ⁺ 300 mosm	Verdünner 150 mosm	Verdünner 500 mosm	Verdünner 1200 mosm
Vorwärtsbewegung (%)	80,7 $\pm$ 3,45	15,7 $\pm$ 5,34*	3,3 $\pm$ 1,60*	0
Ortsbewegung (%)	0,7 $\pm$ 1,89	15,7 $\pm$ 5,34*	4,7 $\pm$ 0,75*	0
pathologische Bewegung (%)	0	11,4 $\pm$ 3,78	0	0
ungefärbte Spermien (%)	85,4 $\pm$ 6,71	64,9 $\pm$ 11,16*	79,9 $\pm$ 7,99	48,6 $\pm$ 18,73*
intakte Akrosome (%)	91,6 $\pm$ 2,42	85,1 $\pm$ 4,43*	89,1 $\pm$ 1,96	61,4 $\pm$ 8,65*

* Differenz zum Kontrollwert signifikant (t-Test)
⁺ Kontrollwert

Tab. 28: Einfluß unterschiedlicher Osmolalitäten verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ beim Bullen ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 7$ Ejakulaten; 5 von Bulle 1 und je 1 Ejakulat von Bulle 2 und 3)

Art der Anomalien	Verdünnner ⁺⁺ 300 mosm	Verdünnner 150 mosm	Verdünnner 500 mosm	Verdünnner 1200 mosm
primäre:	1,27 $\pm$ 0,39	1,17 $\pm$ 0,83	1,45 $\pm$ 0,39	1,58 $\pm$ 0,52
Kopf	0,91 $\pm$ 0,44	0,58 $\pm$ 0,35	1,01 $\pm$ 0,31	0,82 $\pm$ 0,46
Mitte	0,31 $\pm$ 0,37	0,58 $\pm$ 0,79	0,40 $\pm$ 0,36	0,71 $\pm$ 0,32
Schwanz	0	0	0	0
Doppel	0,04 $\pm$ 0,11	0	0,04 $\pm$ 0,11	0,04 $\pm$ 0,11
sekundäre:	1,98 $\pm$ 0,91	61,14 $\pm$ 12,88*	4,65 $\pm$ 3,31	7,20 $\pm$ 3,31*
Lk	0,52 $\pm$ 0,25	0,78 $\pm$ 0,28	0,44 $\pm$ 0,45	0,44 $\pm$ 0,32
Krm	1,15 $\pm$ 1,00	21,82 $\pm$ 7,84*	1,64 $\pm$ 1,13	2,58 $\pm$ 1,83
Krmf	0,08 $\pm$ 0,14	3,91 $\pm$ 6,09	0,21 $\pm$ 0,22	0,17 $\pm$ 0,23
Krschw	0,17 $\pm$ 0,23	34,61 $\pm$ 15,14*	2,35 $\pm$ 2,67*	3,91 $\pm$ 3,08*
Krbruch	0,04 $\pm$ 0,11	0	0	0,08 $\pm$ 0,22
Artefakte:	0	0	0,04 $\pm$ 0,11	0
Arthals	0	0	0,04 $\pm$ 0,11	0
Artschw	0	0	0	0
gesamt:	3,25 $\pm$ 1,21	62,31 $\pm$ 13,14*	6,15 $\pm$ 2,98*	8,78 $\pm$ 3,05*
Zyt:	7,28 $\pm$ 4,33	7,05 $\pm$ 4,86	6,30 $\pm$ 3,82	6,28 $\pm$ 4,08

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)

⁺⁺ Kontrollwert

* Differenz zum Kontrollwert signifikant (t-Test)



Übersicht; Objektiv 40 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor



Krümmung im Mittelstück (Krm); Akrosom geschwollen;
Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

Abb. 10: Bullenspermien; Verdünner 150 mosm/kg (oben);
Verdünner 1200 mosm/kg (unten)

4.4.2. Schafbock

Sowohl im hypotonen als auch im hypertonen Verdünner von 500 mosm/kg konnten nur vereinzelt vorwärtsbewegliche Spermien beobachtet werden. Die Ortsbeweglichkeit der Samenzellen stieg bei 150 mosm/kg auf 20 %. Im Verdünner von 1200 mosm/kg waren alle Spermien bewegungslos. Der Anteil "lebender" Spermien wurde bei 150 mosm/kg und 1200 mosm/kg deutlicher herabgesetzt als bei 500 mosm/kg. Die Schädigung des intakten Akrosoms war geringgradig, erst im hypertonen Medium mit 1200 mosm/kg wurde sie ausgeprägter (Tab. 29).

Der Einfluß der Osmolalität wirkte sich nur auf den Anteil sekundärer Anomalien aus. Eine deutliche Steigerung der Anzahl der Krümmlinge, insbesondere der Spermien mit Einfachkrümmung im Mittelstück (Krm) und der Schwanzkrümmungen (Krschw) zeigte sich im hypotonen Medium. Wesentlich geringer war die Steigerung sekundärer Anomalien im hypertonen Verdünner (Tab. 30; Abb. 11).

Tab. 29: Einfluß unterschiedlicher Osmolalitäten verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und "lebender" Spermien sowie den Anteil intakter Akrosome bei 1 Schafbock ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 3$ Ejakulaten)

Parameter	Verdünner ⁺ 300 mosm	Verdünner 150 mosm	Verdünner 500 mosm	Verdünner 1200 mosm
Vorwärtsbewegung (%)	75,0 $\pm$ 5,00	5,0 $\pm$ 0	2,0 $\pm$ 0	0
Ortsbewegung (%)	3,3 $\pm$ 2,88	20,0 $\pm$ 10,00	4,3 $\pm$ 1,15	0
ungefärbte Spermien (%)	81,7 $\pm$ 3,21	67,9 $\pm$ 7,47	76,4 $\pm$ 1,69	60,2 $\pm$ 8,51
intakte Akrosome (%)	93,2 $\pm$ 1,05	90,5 $\pm$ 1,65	91,0 $\pm$ 2,03	82,4 $\pm$ 3,48

⁺ Kontrollwert

Tab. 30: Einfluß unterschiedlicher Osmolalitäten verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ bei 1 Schafbock ($\bar{x} \pm s$ aus n = 3 Ejakulaten)

Art der Anomalien	Verdüner ⁺⁺ 300 mosm	Verdüner 150 mosm	Verdüner 500 mosm	Verdüner 1200 mosm
primäre:	0,93 $\pm$ 0,65	0,93 $\pm$ 0,95	0,40 $\pm$ 0,17	1,00 $\pm$ 0,17
Kopf	0,40 $\pm$ 0,17	0,30 $\pm$ 0,30	0,20 $\pm$ 0,17	0,50 $\pm$ 0,17
Mitte	0,53 $\pm$ 0,50	0,63 $\pm$ 0,65	0,20 $\pm$ 0,17	0,50 $\pm$ 0,17
Schwanz	0	0	0	0
Doppel	0	0	0	0
sekundäre:	0,83 $\pm$ 0,40	47,33 $\pm$ 12,76	1,90 $\pm$ 0,30	3,36 $\pm$ 0,80
Lk	0	0,10 $\pm$ 0,17	0,40 $\pm$ 0,17	0
Krm	0,43 $\pm$ 0,75	30,30 $\pm$ 5,00	0,30 $\pm$ 0,30	1,53 $\pm$ 0,68
Krmf	0	0,96 $\pm$ 0,35	0,10 $\pm$ 0,17	0,20 $\pm$ 0,34
Krschw	0,40 $\pm$ 0,34	15,96 $\pm$ 7,81	1,10 $\pm$ 0,17	1,63 $\pm$ 0,35
Krbruch	0	0	0	0
Artefakte:	0	0	0	0
Arthals	0	0	0	0
Artschw	0	0	0	0
gesamt:	1,76 $\pm$ 0,75	48,26 $\pm$ 13,56	2,30 $\pm$ 0,17	4,36 $\pm$ 0,80
Zyt:	1,76 $\pm$ 1,32	2,20 $\pm$ 1,70	2,30 $\pm$ 1,48	1,96 $\pm$ 1,42

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)
⁺⁺ Kontrollwert



Krümmung im Mittelstück (Krm) und am Schwanzende (Krschw)



Mehrfachkrümmung (Krmf)

Abb. 11: Schafbockspermien; Verdünner 150 mosm/kg
Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

4.4.3. Ziegenbock

Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien wurde im hypertonen Medium stärker als im hypotonen erniedrigt. Auch bei dieser Spezies konnten im Verdünner mit 1200 mosm/kg keine beweglichen Samenzellen festgestellt werden. Ein Absinken des Anteils "lebender" Spermien ließ sich nur bei 1200 mosm/kg deutlich erkennen.

Eine geringgradige Schädigung der intakten Akrosome konnte nur unter extrem hypertonen Verhältnissen von 1200 mosm/kg beobachtet werden (Tab. 31).

Der Anstieg sekundärer Spermienanomalien im hypotonen Medium war beim Ziegenbock besonders stark ausgeprägt. Im Verdünner mit der Osmolalität von 150 mosm/kg erhöhte sich der Anteil sekundärer Anomalien auf 77,5 % gegenüber dem Ausgangswert bei 300 mosm/kg von 2,41 %. In erster Linie ließ sich dies auf das vermehrte Vorkommen von Spermien mit Einfachkrümmungen im Mittelstück (Krm) zurückführen. Aber auch der Anteil an Spermien mit Krümmungen am Schwanzende (Krschw) und Mehrfachkrümmungen (Krmf) konnte durch diese Noxe deutlich gesteigert werden. Dagegen waren Auswirkungen im hypertonen Verdünner von 500 mosm/kg kaum ersichtlich. Erst bei 1200 mosm/kg war eine erhöhte Anzahl der Spermienanomalien, insbesondere der oben genannten Formen zu beobachten (Tab. 32; Abb. 12).

Tab. 31: Einfluß unterschiedlicher Osmolalitäten verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und "lebender" Spermien sowie den Anteil intakter Akrosome beim Ziegenbock ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 4$ Ejakulaten; 3 von Ziegenbock 1 und 1 Ejakulat von Ziegenbock 2)

Parameter	Verdüner ⁺ 300 mosm	Verdüner 150 mosm	Verdüner 500 mosm	Verdüner 1200 mosm
Vorwärtsbewegung (%)	77,5 $\pm$ 5,00	12,5 $\pm$ 6,45	3,0 $\pm$ 2,44	0
Ortsbewegung (%)	0	17,5 $\pm$ 5,00	12,5 $\pm$ 5,00	0
ungefärbte Spermien (%)	89,9 $\pm$ 2,66	82,7 $\pm$ 8,87	87,6 $\pm$ 3,62	72,8 $\pm$ 11,49
intakte Akrosome (%)	95,6 $\pm$ 1,17	93,2 $\pm$ 6,91	94,7 $\pm$ 1,74	90,7 $\pm$ 4,68

⁺ Kontrollwert

Tab. 32: Einfluß unterschiedlicher Osmolalitäten verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ beim Ziegenbock ($\bar{x} \pm s$ aus n = 4 Ejakulaten; 3 von Ziegenbock 1 und 1 Ejakulat von Ziegenbock 2)

Art der Anomalien	Verdüner ⁺⁺ 300 mosm	Verdüner 150 mosm	Verdüner 500 mosm	Verdüner 1200 mosm
primäre:	0,52 $\pm$ 0,51	0,95 $\pm$ 0,79	0,70 $\pm$ 0,90	0,47 $\pm$ 0,56
Kopf	0,22 $\pm$ 0,28	0,30 $\pm$ 0,24	0,15 $\pm$ 0,30	0,40 $\pm$ 0,42
Mitte	0,30 $\pm$ 0,24	0,65 $\pm$ 0,75	0,40 $\pm$ 0,61	0,07 $\pm$ 0,15
Schwanz	0	0	0,15 $\pm$ 0,30	0
Doppel	0	0	0	0
sekundäre:	2,41 $\pm$ 1,64	77,45 $\pm$ 8,50	3,07 $\pm$ 3,71	8,70 $\pm$ 13,89
Lk	0,57 $\pm$ 0,50	0,90 $\pm$ 1,42	0,32 $\pm$ 0,47	0,55 $\pm$ 0,55
Krm	1,05 $\pm$ 0,88	56,87 $\pm$ 2,29	1,87 $\pm$ 2,95	4,05 $\pm$ 7,50
Krmf	0,07 $\pm$ 0,15	4,22 $\pm$ 5,04	0,22 $\pm$ 0,15	0,15 $\pm$ 0,30
Krschw	0,72 $\pm$ 0,34	15,55 $\pm$ 5,23	0,65 $\pm$ 0,67	3,95 $\pm$ 5,62
Krbruch	0	0	0	0
Artefakte:	0	0	0	0
Arthals	0	0	0	0
Artschw	0	0	0	0
gesamt:	2,95 $\pm$ 1,98	78,40 $\pm$ 9,07	3,77 $\pm$ 4,55	9,17 $\pm$ 14,44
Zyt:	7,15 $\pm$ 7,94	6,45 $\pm$ 7,48	6,82 $\pm$ 7,49	6,72 $\pm$ 7,72

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)
⁺⁺ Kontrollwert



Krümmung im Mittelstück
(Krm)



Mehrfachkrümmung
(Krmf)



Krümmung am Schwanzende (Krschw)

Abb. 12: Ziegenbockspermien; Verdünner 150 mosm/kg;
Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

4.4.4. Hengst

Auch beim Hengst war die Abnahme der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien im hypertonen Medium ausgeprägter als im hypotonen. Jedoch konnten bei dieser Spezies noch vereinzelt ortsbewegliche Samenzellen im Verdünnung mit 1200 mosm/kg beobachtet werden. Ca. 10 % der Spermien wiesen sowohl bei 150 mosm/kg als auch bei 500 mosm/kg pathologische Bewegungsformen auf. Der Prozentsatz "lebender" Spermien wurde in allen Verdünnern mit veränderter Osmolalität herabgesetzt (Tab. 33).

Eine Steigerung der Anzahl der Spermienanomalien ließ sich beim Hengst nur im hypotonen Medium erzielen. Auffallend war neben dem erhöhten Vorkommen an Spermien mit Einfachkrümmungen im Mittelstück (Krm) ein vermehrtes Auftreten von gekrümmten Mittelstücken mit Aufspaltung und Bruch (Krbruch)-(Tab. 34; Abb. 13).

Tab. 33: Einfluß unterschiedlicher Osmolalitäten verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher, Spermien mit pathologischer Bewegung sowie den Anteil "lebender" Spermien bei 1 Hengst ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 3$ Ejakulaten)

Parameter	Verdüner ⁺ 300 mosm	Verdüner 150 mosm	Verdüner 500 mosm	Verdüner 1200 mosm
Vorwärtsbewegung (%)	56,7 $\pm$ 5,77	20,0 $\pm$ 0	13,3 $\pm$ 5,77	0
Ortsbewegung (%)	1,7 $\pm$ 2,88	26,7 $\pm$ 5,77	13,3 $\pm$ 5,77	3,0 $\pm$ 1,73
pathologische Bewegung (%)	0	10,0 $\pm$ 0	8,3 $\pm$ 2,88	0
ungefärbte Spermien (%)	83,5 $\pm$ 5,16	76,1 $\pm$ 4,74	73,6 $\pm$ 4,36	69,4 $\pm$ 6,49

⁺ Kontrollwert

Tab. 34: Einfluß unterschiedlicher Osmolalitäten verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ bei 1 Hengst ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 3$ Ejakulaten)

Art der Anomalien	Verdüner ⁺⁺ 300 mosm	Verdüner 150 mosm	Verdüner 500 mosm	Verdüner 1200 mosm
primäre:	2,23 $\pm$ 1,35	3,26 $\pm$ 1,52	2,56 $\pm$ 0,55	2,13 $\pm$ 0,50
Kopf	1,40 $\pm$ 0,72	1,20 $\pm$ 0,17	1,30 $\pm$ 0,30	1,40 $\pm$ 0,34
Mitte	0,43 $\pm$ 0,75	1,66 $\pm$ 1,52	0,73 $\pm$ 0,51	0,43 $\pm$ 0,51
Schwanz	0,10 $\pm$ 0,17	0	0,30 $\pm$ 0,57	0,10 $\pm$ 0,17
Doppel	0,30 $\pm$ 0,30	0,40 $\pm$ 0,17	0,20 $\pm$ 0,17	0,20 $\pm$ 0,34
sekundäre:	9,66 $\pm$ 4,08	29,96 $\pm$ 3,90	11,56 $\pm$ 1,51	9,23 $\pm$ 3,43
Lk	0,86 $\pm$ 0,23	1,10 $\pm$ 0,17	0,73 $\pm$ 0,23	0,86 $\pm$ 0,23
Krm	2,43 $\pm$ 0,98	12,63 $\pm$ 4,50	2,43 $\pm$ 2,20	1,76 $\pm$ 0,40
Krmf	0,10 $\pm$ 0,10	0,20 $\pm$ 0,17	0,10 $\pm$ 0,17	0,30 $\pm$ 0,30
Krschw	0,20 $\pm$ 0,34	4,76 $\pm$ 3,53	0,43 $\pm$ 0,75	0,43 $\pm$ 0,75
Krbruch	6,06 $\pm$ 3,10	11,26 $\pm$ 1,52	7,86 $\pm$ 1,80	5,86 $\pm$ 3,23
Artefakte:	0	0	0	0,20 $\pm$ 0,34
Arthals	0	0	0	0
Artschw	0	0	0	0,20 $\pm$ 0,34
gesamt:	11,90 $\pm$ 5,05	33,23 $\pm$ 3,95	14,13 $\pm$ 1,35	11,56 $\pm$ 3,72
Zyt:	19,86 $\pm$ 2,71	19,40 $\pm$ 4,01	18,86 $\pm$ 2,41	18,43 $\pm$ 3,15

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)

⁺⁺ Kontrollwert



Übersicht; Objektiv 40 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2



Krümmung im Mittelstück
(Krim)



Krümmung mit Aufsplissung
(Krbruch)

Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

4.4.5. Eber

Der prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien betrug beim Eber in der Kontrollprobe mit der Osmolalität von 300 mosm/kg $75 \pm 5,0 \%$. Im hypertonen Medium erniedrigte sich der Prozentsatz auf $23 \pm 7,6 \%$ ($P < 0,001$). Gleichzeitig erhöhten sich in dieser Probe die Ortsbeweglichkeit auf $17 \pm 9,5 \%$ ($P = 0,015$) und der Anteil pathologisch beweglicher Spermien auf $21 \pm 9,0 \%$ ($P = 0,001$). Im hypertonen Verdünner mit 500 mosm/kg zeigten $13 \pm 4,9 \%$ ($P < 0,001$) der Samenzellen Vorwärtsbewegung. Der Anteil ortsbeweglicher Spermien lag bei $20 \pm 8,4 \%$ ($P = 0,002$). Pathologische Bewegungsformen wurden nur vereinzelt beobachtet. Im Verdünner mit 1200 mosm/kg waren alle Samenzellen bewegungslos. Der Prozentsatz "lebender" Spermien konnte in keinem Fall gegenüber dem Ausgangswert von $64 \pm 14,2 \%$ signifikant verändert werden.

Die Akrosomenmorphologie zeigte gegenüber dem Kontrollwert mit $94 \pm 3,4 \%$ weder in der hypotonen noch in den beiden hypertonen Proben signifikante Unterschiede (Tab. 35).

Ein signifikanter Anstieg der Spermienanomalien ließ sich beim Eber nur in der hypoton verdünnten Probe aufzeigen. Die sekundären Anomalien, deren Anteil bei 300 mosm/kg $2,04 \pm 1,65 \%$ betrug, erhöhten sich im Verdünner mit 150 mosm/kg auf $19,4 \pm 13,39 \%$ ($P = 0,005$). Bedingt war dies durch das vermehrte Vorkommen von Spermien mit Einfachkrümmungen im Mittelstück (Krm). Der Wert dieses Parameters stieg von $1,24 \pm 1,61 \%$ auf $18,11 \pm 12,84 \%$ ($P = 0,005$).

Neben den Veränderungen des Anteils sekundärer Formen war bei dieser Spezies auch ein geringer Anstieg primärer Anomalien des Mittelstückes (Mitte) zu beobachten. Es handelte sich hier hauptsächlich um Spermien, bei denen Mittelstück und Schwanz vollständig verschlungen an der Kopfbasis lagen (Tab. 36; Abb. 14).

Tab. 35: Einfluß unterschiedlicher Osmolalitäten verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und "lebender" Spermien sowie den Anteil intakter Akrosome beim Eber ($\bar{x} \pm s$ aus $n = 7$ Ejakulaten; 5 von Eber 1 und je 1 Ejakulat von Eber 2 und 3)

Parameter	Verdüner ⁺ 300 mosm	Verdüner 150 mosm	Verdüner 500 mosm	Verdüner 1200 mosm
Vorwärtsbewegung (%)	75,0 $\pm$ 5,00	22,9 $\pm$ 7,55*	12,9 $\pm$ 4,88*	0
Ortsbewegung (%)	5,0 $\pm$ 4,08	17,1 $\pm$ 9,51*	20,7 $\pm$ 8,38*	0
pathologische Bewegung (%)	0	21,4 $\pm$ 8,99	1,4 $\pm$ 2,44	0
ungefärbte Spermien (%)	64,4 $\pm$ 14,15	69,2 $\pm$ 8,90	66,1 $\pm$ 10,38	72,0 $\pm$ 8,23
intakte Akrosome (%)	94,0 $\pm$ 3,36	91,6 $\pm$ 3,71	93,9 $\pm$ 2,91	90,4 $\pm$ 5,62

* Differenz zum Kontrollwert signifikant (t-Test)

+ Kontrollwert

Tab. 36: Einfluß unterschiedlicher Osmolalitäten verdünnter Samenproben auf den Prozentsatz der Spermienanomalien⁺ beim Eber
($\bar{x} \pm s$ aus $n = 7$ Ejakulaten; 5 von Eber 1 und je 1 Ejakulat von Eber 2 und 3)

Art der Anomalien	Verdünnung ⁺⁺ 300 mosm	Verdünnung 150 mosm	Verdünnung 500 mosm	Verdünnung 1200 mosm
primäre:	2,08 $\pm$ 0,66	3,27 $\pm$ 1,66	2,34 $\pm$ 1,22	2,20 $\pm$ 1,03
Kopf	1,95 $\pm$ 0,59	2,35 $\pm$ 1,10	1,95 $\pm$ 0,94	2,02 $\pm$ 1,02
Mitte	0,12 $\pm$ 0,16	0,82 $\pm$ 0,83*	0,30 $\pm$ 0,30	0,17 $\pm$ 0,16
Schwanz	0	0	0	0
Doppel	0	0,08 $\pm$ 0,14	0,08 $\pm$ 0,14	0
sekundäre:	2,04 $\pm$ 1,65	19,41 $\pm$ 13,39*	1,48 $\pm$ 1,04	2,62 $\pm$ 1,30
Lk	0,65 $\pm$ 1,22	0,17 $\pm$ 0,16	0,41 $\pm$ 0,42	0,21 $\pm$ 0,22
Krm	1,34 $\pm$ 1,61	18,11 $\pm$ 12,84*	1,02 $\pm$ 0,78	2,07 $\pm$ 1,15
Krmf	0	0,60 $\pm$ 0,52	0	0,08 $\pm$ 0,14
Krschw	0,04 $\pm$ 0,11	0,52 $\pm$ 0,44*	0,04 $\pm$ 0,11	0,17 $\pm$ 0,23
Krbruch	0	0	0	0,08 $\pm$ 0,14
Artefakte:	0	0	0	0,04 $\pm$ 0,11
Arthals	0	0	0	0
Artschw	0	0	0	0,04 $\pm$ 0,11
gesamt:	4,12 $\pm$ 1,64	22,68 $\pm$ 12,20*	3,82 $\pm$ 0,75	4,87 $\pm$ 1,16
Zyt:	21,20 $\pm$ 23,98	20,87 $\pm$ 22,68	22,17 $\pm$ 24,47	21,05 $\pm$ 23,43

* Differenz zum Kontrollwert signifikant (t-Test)

+ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)

++ Kontrollwert



Krümmungen im Mittelstück (Krm)



1 primäre Anomalie, ohne Akrosom; 2 Spermium der Norm entsprechend

Abb. 14: Eberspermien; Verdünner 150 mosm/kg;

Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

4.4.6. Tierartlicher Vergleich

Die Schädigung der Samenzellen unter dem Einfluß veränderter Osmolalität zeigte die deutlichsten Auswirkungen im Verlust der Vorwärtsbeweglichkeit und in dem vor allem im hypertonen Medium massiv gesteigerten Anteil sekundärer Spermienanomalien. Im Verdünner mit 1200 mosm/kg waren die Samenzellen aller untersuchten Spezies mit Ausnahme des Hengstes, der noch vereinzelt ortsbewegliche Spermien aufwies, völlig bewegungslos.

Im Gegensatz dazu stand der Prozentsatz "lebender" Spermien. Im hypertonen Medium konnten beim Bullen 76 % und beim Schafbock 83 % des Kontrollwertes ausgezählt werden. Ausgeprägter war die Reaktion im hypertonen Verdünner 1200 mosm/kg beim Bullen von 57 %, beim Schafbock von 74 %. Ziegenbock und Hengst wiesen deutlich geringere Abweichungen auf. Beim Eber war die Anzahl "lebender" Spermien in den drei Proben mit veränderter Osmolalität nicht erniedrigt.

Ein ähnliches Verhalten ließ sich bei der Auswirkung dieser Noxe auf die Akrosomenmorphologie beobachten. Beim Bullen konnten gegenüber dem Kontrollwert im hypertonen Verdünner mit 1200 mosm/kg 67 % intakte Akrosome gefunden werden, beim Schafbock 88 %. Bei allen anderen untersuchten Tierarten betrug die Erniedrigung des Anteils intakter Akrosome jedoch kaum mehr als 5 % des Ausgangswertes (Tab. 37).

Der prozentuale Anteil sekundärer Anomalien stieg beim Ziegenbock im hypotonen Verdünner mit 150 mosm/kg auf 77 %, beim Bullen auf 61 % und beim Schafbock auf 47 %. Während der Überwiegende Anteil der Steigerung bei Schaf- und Ziegenbock in den Spermien mit Einfachkrümmung im Mittelstück (Krm) zu sehen war, ließ sich dies beim Bullen auf den vermehrten Anteil der Krümmungen am Schwanzende (Krschw) zurückführen. Alle Wiederkäuer zeigten auch in den hypertonen Medien eine leicht erhöhte Anzahl sekundärer Anomalien. Hengst und Eber reagierten nur im hypotonen Verdünner von 150 mosm/kg mit einer deutlichen Beeinflussung auf den Prozentsatz sekundärer Anomalien. Nur beim Hengst konnte ein wesentlicher Prozentsatz an Spermien mit Aufsplissungen und Bruch im Mittelstück (Krbruch) beobachtet werden, der bei 150 mosm/kg deutlich gesteigert war.

Tab. 37: Relative Abweichungen des Prozentsatzes an vorwärtsbeweglichen und lebenden Spermien sowie intakten Akrosomen als Reaktion auf unterschiedliche Osmolalitäten verdünnter Samenproben (Ausgangswerte 100 %)

Tierart Ejakulate	Vorwärtsbewegung			ungefärbte Spermien			intakte Akrosome		
	150 mosm	500 mosm	1200 mosm	150 mosm	500 mosm	1200 mosm	150 mosm	500 mosm	1200 mosm
Bulle n = 7	19,5	4,1	0	76,0	93,6	57,0	92,9	97,2	67,1
Schafbock n = 3	6,7	2,7	0	83,1	93,6	73,7	97,1	97,6	88,4
Ziegenbock n = 4	16,1	3,9	0	92,0	97,5	81,0	97,5	99,1	94,9
Hengst n = 3	64,7	23,5	0	91,1	88,2	83,1	-	-	-
Eber n = 7	30,5	17,1	0	107,4	102,6	112,0	97,5	99,9	96,1

4.5. Vergleich der Auswertungsverfahren

Im folgenden werden die Ergebnisse der morphologischen Beurteilung der drei eingesetzten Verfahren einander gegenübergestellt.

Zunächst wurde überprüft, ob sich zwischen den mikroskopischen Methoden Phasenkontrast und Differential-Interferenzkontrast Unterschiede aufzeigen ließen. Hierbei stand in beiden Fällen eine in Formolsalzlösung flüssigfixierte, verdünnte Samenprobe zur Verfügung (3.5.2.).

Des weiteren wurden die Ergebnisse der flüssigfixierten im Phasenkontrast untersuchten Probe mit denen, der im Hellfeld ausgewerteten Ausstrichpräparate (gefärbt nach Farelly, 3.5.1.) verglichen.

4.5.1. Flüssigfixierung Phasenkontrast / Differential-Interferenzkontrast

Die Ergebnisse dieser beiden Methoden erschienen in allen morphologischen Parametern bei den untersuchten Tierarten identisch. Signifikante Unterschiede ließen sich in keinem Fall aufzeigen (Tab. 38 - 42). Die Beurteilung der Akrosomenmorphologie erforderte bei der Differential-Interferenzkontrast Methode eine etwas längere Einarbeitungszeit. Der Zeitaufwand für die Beurteilung eines Präparates war bei beiden Methoden gleich.

4.5.2. Flüssigfixierung Phasenkontrast / Färbung Farelly

Hellfeld

Die Gesamtzahl der Anomalien lag bei Bulle, Schafbock und Eber in den gefärbten Spermienausstrichen etwa doppelt so hoch wie in den flüssigfixierten Proben. Im Gegensatz dazu konnte weder beim Ziegenbock noch beim Hengst ein Unterschied in der Summe der Anomalien zwischen Färbung und Flüssigfixierung aufgezeigt werden.

Beim Bullen stieg die Zahl der sekundären Anomalien von 2 % in der Flüssigfixierung auf 5,1 % im Ausstrichpräparat ($P < 0,001$). Im wesentlichen hatte dies seine Ursache in einem mit 3 % gegenüber 0,5 % deutlich höheren Anteil loser Köpfe ($P < 0,001$). Artefakte (Abb. 15) ließen sich in der flüssigfixierten Probe nur zu einem sehr geringen Prozentsatz von 0,02 % nachweisen, während in Ausstrichen 3,3 % festgestellt wurden ($P < 0,001$). Der Anteil intakter Akrosome betrug in der flüssigfixierten Probe 88,5 % und 81,3 % ($P < 0,001$) im gefärbten Präparat (Tab. 38).

Ein ähnliches Bild ergab sich beim Schafbock. Gegenüber dem flüssigfixierten Präparat stiegen die Ergebnisse der Färbung bei den sekundären Anomalien von 1 % auf 2,3 % ($P = 0,050$), bei den losen Köpfen von 0,06 % auf 0,8 % ($P = 0,033$) und bei den Artefakten von 0,03 % auf 0,9 % ($P = 0,010$). Der Anteil intakter Akrosome war zwar im Ausstrichpräparat erniedrigt, es konnte jedoch keine signifikante Beziehung hergestellt werden (Tab. 39).

Beim Ziegenbock wurden im Ausstrich mit 0,9 % höhere Werte an Artefakten festgestellt als in der Flüssigfixierung mit 0,07 % ($P = 0,034$). Die Anzahl intakter Akrosome war in der Färbung mit 90,6 % niedriger als in der flüssigfixierten Probe mit 93,3 % ($P = 0,031$). Der Prozentsatz sekundärer Anomalien lag in der Flüssigfixierung mit 2,6 % höher als im Ausstrichpräparat mit 1,8 %. Zurückzuführen war dies auf das vermehrte Vorkommen (0,7 % gegenüber 0,3 %, $P = 0,014$) von Krümlingen am Schwanzende (Krschw) in der flüssigfixierten Probe (Tab. 40).

Die Anzahl loser Köpfe war auch beim Hengst in der Färbung mit 1,7 %, gegenüber dem in der flüssigfixierten Probe ermittelten Wert von 0,9 % ($P = 0,045$) erhöht. Der prozentuale Anteil an Krümlingen mit Bruch oder Aufsplissung im Mittelstück (Krbruch) lag jedoch in der Flüssigfixierung mit 7,7 % deutlich höher als in den gefärbten Ausstrichpräparaten mit 4,5 % ($P = 0,021$; Tab. 41).

Auch beim Eber wurden in den gefärbten Präparaten höhere Werte als bei der Flüssigfixierung ermittelt. Bei den sekundären Anomalien stiegen sie von 2,2 % auf 3,7 % ($P = 0,006$), bei den losen Köpfen von 0,4 % auf 1,1 % ($P = 0,008$) und bei den Artefakten von 0 % auf 0,5 % ($P = 0,005$). Der prozentuale Anteil intakter Akrosome betrug in der flüssigfixierten Probe 93,4 % und im Ausstrichpräparat 91,4 % (Tab. 42).

Der Prozentsatz an Spermien mit Zytoplasmatröpfchen lag bei allen untersuchten Tierarten im Ausstrichpräparat niedriger als in der flüssigfixierten Probe. Auf Grund der hohen Streuung der Einzelwerte bei diesem Parameter ergaben sich keine signifikanten Beziehungen.

Tab. 38: Vergleich der morphologischen Auswertungsverfahren verdünnter Samenproben beim Bullen ($\bar{x}$ in % aus $n = 21$ Ejakulaten; 15 von Bulle 1 und je 3 Ejakulate von Bulle 2 und 3)

Art der Anomalien	Hancock Interferenz	Hancock Phasenkontrast	Fareilly Hellfeld
primäre:	1,15	1,05	1,19
Kopf	0,76	0,68	0,91
Mitte	0,37	0,31	0,26
Schwanz	0	0	0
Doppel	0,01	0,05	0,01
sekundäre:	2,11	1,96	===== 5,10
Lk	0,75	0,55	===== 2,99
Krm	1,07	1,02	1,57
Krmf	0,08	0,16	0,10
Krschw	0,20	0,18	0,28
Krbruch	0	0,02	0,15
Artefakte:	0	0,02	===== 2,25
Arthals	0	0	===== 1,86
Artschw	0	0,02	----- 0,38
gesamt:	3,27	3,04	===== 8,55
Zyt:	5,53	5,79	4,21
NAR	88,87	88,53	===== 81,32

+ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)

----- $P \leq 0,05$ (t-Test)
 ===== $P \leq 0,01$

Tab. 39: Vergleich der morphologischen Auswertungsverfahren verdünnter Samenproben beim Schafbock ($\bar{x}$ in % aus n = 9 Ejakulaten)

Art der Anomalien	Hancock Interferenz	Hancock Phasenkontrast	Fareilly Hellfeld
primäre:	0,64	0,54	0,41
Kopf	0,51	0,33	0,37
Mitte	0,13	0,21	0
Schwanz	0	0	0
Doppel	0	0	0,03
sekundäre:	1,38	1,00	2,26
Lk	0,20	0,06	0,78
Krm	0,67	0,60	0,71
Krmf	0,16	0,03	0,13
Krschw	0,34	0,30	0,60
Krbruch	0	0	0,03
Artefakte:	0	0,03	0,86
Arthals	0	0,03	0,75
Artschw	0	0	0,11
gesamt:	2,03	1,57	3,54
Zyt:	2,41	2,31	1,00
NAR	94,68	93,96	91,25

+ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)
 ----- P $\leq$ 0,05 (t-Test)
 ===== P $\leq$ 0,01

Tab. 40: Vergleich der morphologischen Auswertungsverfahren verdünnter Samenproben beim Ziegenbock ($\bar{x}$ in % aus $n = 12$ Ejakulaten; 9 von Ziegenbock 1 und 3 Ejakulate von Ziegenbock 2)

Art der Anomalien	Hancock Interferenz	Hancock Phasenkontrast	Fareilly Hellfeld
primäre:	0,54	0,55	0,56
Kopf	0,27	0,38	0,41
Mitte	0,26	0,17	0,07
Schwanz	0	0	0
Doppel	0	0	0,07
sekundäre:	2,55	2,59	1,76
Lk	0,47	0,48	0,75
Krm	1,32	1,29	0,69
Krmf	0,12	0,02	0,02
Krschw	0,58	0,68	0,30
Krbruch	0,05	0,10	0
Artefakte:	0	0,07	0,93
Arthals	0	0,02	0,85
Artschw	0	0,05	0,08
gesamt:	3,10	3,22	3,26
Zyt:	4,25	4,11	2,10
NAR	93,67	93,29	90,60

⁺ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)
 ----- $P \leq 0,05$ (t-Test)

Tab. 41: Vergleich der morphologischen Auswertungsverfahren verdünnter Samenproben bei 1 Hengst ($\bar{x}$ in % aus n = 9 Ejakulaten)

Art der Anomalien	Hancock Interferenz	Hancock Phasenkontrast	Fareilly Hellfeld
primäre:	2,08	2,35	2,71
Kopf	1,18	1,34	1,44
Mitte	0,48	0,42	1,13
Schwanz	0,31	0,28	0,03
Doppel	0,10	0,30	0,10
sekundäre:	12,83	12,25	9,86
Lk	0,85	0,90	1,67
Krm	3,33	3,12	2,97
Krmf	0,31	0,24	0,16
Krschw	0,44	0,24	0,55
Krbruch	7,88	7,74	4,48
Artefakte:	0,16	0,06	0,24
Arthals	0	0,03	0,10
Artschw	0,16	0,03	0,14
gesamt:	15,08	14,67	12,82
Zyt:	27,40	28,30	19,77

+ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)
 ----- $P \leq 0,05$ (t-Test)

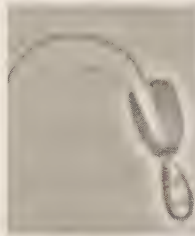
Tab. 42: Vergleich der morphologischen Auswertungsverfahren verdünnter Samenproben beim Eber ($\bar{x}$ in % aus n = 21 Ejakulaten; 15 von Eber 1 und je 3 Ejakulate von Eber 2 und 3)

Art der Anomalien	Hancock Interferenz	Hancock Phasenkontrast	Fareilly Hellfeld
primäre:	1,76	1,66	2,21
Kopf	1,65	1,53	1,92
Mitte	0,11	0,11	0,29
Schwanz	0	0,01	0
Doppel	0	0	0
sekundäre:	2,12	2,16	3,65
Lk	0,15	0,42	1,14
Krm	1,74	1,60	2,25
Krmf	0,10	0,02	0,10
Krschw	0,08	0,10	0,13
Krbruch	0,04	0	0,01
Artefakte:	0	0	0,51
Arthals	0	0	0,32
Artschw	0	0	0,18
gesamt:	3,89	3,82	6,38
Zyt:	13,22	12,96	9,24
NAR	93,57	93,47	91,40

+ Abkürzungen der morphologischen Klassifizierung (3.7.1.)
 ----- P $\leq$ 0,05 (t-Test)
 ===== P $\leq$ 0,01



lose Köpfe - Ursache: Wasserabspülung (Fareilly-Färbung)
Objektiv 16 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2



Bruch im Schwanz "Kopfspaltung"
Ursache: Druck des Deckglases (Flüssigfixierung)
Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2



Abknickung Hals - Ursache: Ausstrichtechnik (Fareilly-Färbung)
Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

5. Diskussion

Lichtmikroskopisch nachweisbare Formveränderungen der Samenzellen werden als Indikator für pathologische Vorgänge im Genitale herangezogen. Dabei wird das Auftreten von sog. primären Anomalien mit Störungen der Spermatogenese erklärt. Sekundäre Anomalien entstehen, indem normal ausgebildete Spermien durch schädigende Einflüsse in Nebenhoden, Ductus deferens bzw. beim Zusammentreffen mit den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen während der Ejakulation ihre ursprünglich physiologische Gestalt verändern.

Als unmittelbare Ursache für diese Formveränderungen kommen unphysiologische Temperaturen (Entzündungen), pH-Verschiebungen und Änderungen der Elektrolytkonzentration des umgebenden Milieus in Frage. So ist das Entstehen von sogenannten losen Köpfen durch eine lokale Wärmeapplikation ($+43^{\circ}\text{C}$ über 6 Stunden) am Nebenhoden nachgewiesen (EL AZAB, 1966). Auch Krümmlinge und andere Veränderungen des Schwanzes konnten durch experimentelle Eingriffe im Bereich der Nebenhoden erzeugt werden (LEIDL und SPECKER, 1983). Beim Bullen ist das vermehrte Auftreten von sekundären Anomalien, insbesondere von Krümmlingen, nach akuter Vesiculitis seminalis charakteristisch (LEIDL, 1966).

Die für die Entstehung sekundärer Anomalien erwähnten Mechanismen können aber auch bei bzw. nach der Gewinnung, Untersuchung und Konservierung auf die Samenzellen Einfluß nehmen. So kann es

schon bei der Samengewinnung, z.B. im Rahmen einer Zuchttauglichkeitsuntersuchung, zu drastischen Temperaturveränderungen im Ejakulat kommen. In gleicher Weise gilt dies auch für die Aufbewahrung des Nativ-Spermas für den Zeitraum bis zur Untersuchung. In der Praxis der künstlichen Besamung stehen dagegen potentielle Schädigungen durch den Zusatz von Verdünnern und einer dadurch möglichen Verschiebung von pH-Wert oder Elektrolytkonzentration im Vordergrund. Aus alledem läßt sich ableiten, daß Formveränderungen der Spermien, wie sie sekundär im Genitale entstehen, auch post ejaculationem provoziert werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Möglichkeiten der Entstehung von Spermienanomalien nach der Ejakulation, sogenannten "tertiären" Anomalien, aufzuzeigen und hierbei tierartliche Unterschiede qualitativ und quantitativ zu erfassen. Als Modell für die oben genannten Umwelteinflüsse wurden spezifische Noxen gewählt, denen Ejakulate bei der Gewinnung, Untersuchung oder Konservierung bewußt oder unbewußt ausgesetzt sein können.

Bei der Noxe Temperaturerniedrigung wurden zwei Abkühlgeschwindigkeiten gewählt. Die lineare Abkühlung der verdünnten Ejakulate von $0,8^{\circ}\text{C/Min.}$ entspricht in etwa dem 3- bis 4-fachen Wert des in der Praxis im ersten Abkühlschritt des Tiefgefrierprozesses beim Bullen angewandten Verfahrens (PAUFLER, 1974). Mit der plötzlichen Temperaturerniedrigung im Eiswasserbad wurde ein Kälteschock der Samenzellen provoziert.

Morphologische Veränderungen im Sinne tertiärer Anomalien zeigten sich in einem geringgradigen Anstieg der Anzahl der Krümmlinge bei allen untersuchten Tierarten, waren jedoch statistisch nicht zu sichern. Zu berücksichtigen ist, daß Membranschäden, die im Bereich des Mittelstückes und Schwanzes durch Temperaturerniedrigung auftreten und elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurden (WARNAWSKI, 1971; JONES und MARTIN, 1973; WATSON und PLUMMER, 1985) lichtoptisch nicht zu erfassen sind.

Bei der Beurteilung der Akrosomenmorphologie traten deutliche tierartliche Unterschiede auf. So konnten beim Eber schon bei langsamer Abkühlung des verdünnten Samens ausgeprägte und in hoher Anzahl aufgetretene Akrosomenalterationen festgestellt werden. Dagegen tolerierten die Spermien der untersuchten Wiederkäuer diese Noxe relativ gut. Nach Schockabkühlung stieg der prozentuale Anteil an Akrosomenschädigungen drastisch an. Die extremsten Auswirkungen waren wiederum beim Eber zu beobachten. Bei den Wiederkäuern reagierten der Schafbock am deutlichsten und der Bulle am geringsten.

Ein ähnliches Bild, wie oben bei der Akrosomenalteration beschrieben, spiegelte sich in den tierartlich unterschiedlichen Ergebnissen der Motilität und der Vitalfärbung wider (Tab. 15). Somit konnte in weitgehender Übereinstimmung mit dem Schrifttum (WALES und WHITE, 1959; WATSON und PLUMMER, 1985) bezüglich der Empfindlichkeit der untersuchten Spezies gegenüber der Noxe Temperaturerniedrigung folgende Aussage gemacht werden: Die geringste Beeinflussung zeigten Bullenspermien. Beim Ziegen- und

insbesondere beim Schafbock waren die Auswirkungen nach Schockkühlung größer. Die mit Abstand ausgeprägtesten Schädigungen wurden beim Eber gesetzt. Der Hengst wäre in der Rangfolge zwischen die kleinen Wiederkäuer einzuordnen.

Hieraus ist zu folgern, daß bei der morphologischen Beurteilung eines Ejakulates im Rahmen einer Zuchttauglichkeitsuntersuchung, insbesondere im Hinblick auf die forensische Konsequenz einer Aussage, immer auf die Möglichkeit tertiär entstandener Anomalien zu achten ist und tierartliche Unterschiede berücksichtigt werden müssen.

Zur Überprüfung der Reaktion von Samenzellen auf unterschiedliche Wasserstoffionenkonzentrationen wurden die extremen Verhältnisse pH 5 und pH 9 für die Verdünnermedien gewählt. Eine Entstehung tertiärer Anomalien ließ sich mit der in diesem Versuch vorgenommenen Variation der Wasserstoffionenkonzentration nicht provozieren. Der lichtoptische Nachweis geringgradiger Akrosomenschädigungen konnte dagegen erbracht werden. Diese waren im alkalischen Milieu ausgeprägter als im sauren. Um hierbei tierartliche Unterschiede zu beurteilen, erschienen die Abweichungen zu gering.

Das Ausmaß des Motilitätsabfalls (vorwärtsbewegliche Spermien %) zeigte tierartliche Unterschiede, deren Ursache sicherlich auch im Verdünnungsverhältnis und dem dadurch beeinflussten aktuellen pH-Wert zu sehen ist. Im vorliegenden Versuch wurde auf eine bei allen untersuchten Spezies einheitliche Dichte von ca. 100 000 Spermien/ μ l verdünnt. Auf Grund dieser Tatsache läßt sich die

geringe Immobilisierung der Eberspermien (Verdünnungsverhältnis 1:2) gegenüber Bullen (1:10), Schaf- und Ziegenbockspermien (1:25) im alkalischen Bereich erklären. Der extrem hohe Verlust der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien des Ebers im sauren Milieu deutet jedoch auf eine besondere Empfindlichkeit dieser Spezies gegenüber einem niederen pH-Wert hin.

Der Prozentsatz "lebender" (ungefärbter) Spermien war im Vergleich zur Vorwärtsbeweglichkeit nicht (Ziegenbock, Eber) oder nur geringgradig (Bulle, Schafbock, Hengst) erniedrigt. Dieses Ergebnis bestätigt die im Schrifttum gemachten Aussagen und scheint ein Anzeichen für die beschriebene reversible Immobilisierung zu sein (NORMAN und JOHNSON, 1958).

Bei allen untersuchten Tierarten wurde durch die Veränderung der Osmolalität im Samenverdünner eine Steigerung der Spermienanomalien provoziert. Hierbei standen hypotone Medien im Vordergrund. Bei den durch einen hypotonen Verdünner (150 mosm/kg) hervorgerufenen Formveränderungen handelt es sich um Biegungen und Krümmungen des Schwanzes. Die von DREVIUS (1966) an Bullenspermien beschriebene Spiralisierung des Schwanzes und Mittelstückes in hypotonen Medien konnte nur beim Eber nachgewiesen werden. Bei den tierartlich sehr unterschiedlich angestiegenen Prozentsätzen der Spermienanomalien ist wiederum das Verdünnungsverhältnis (3.3.2.) zu beachten. Extrem hypertoner (1200 mosm/kg) Verdünner wirkt sich nur bei den Wiederkäuerspermien in geringem Ausmaß aus. Eine Beeinflussung der Akrosomenalterationen war nur beim

Bullen im extrem hypertonen Bereich stark ausgeprägt. Alle anderen untersuchten Spezies zeigten nur geringgradige Schädigungen des Akrosoms.

Die Bewegungsaktivität der Spermien wurde durch diese Noxe äußerst stark vermindert. Eine größere Empfindlichkeit in hypertonen Bereichen war bei allen untersuchten Spezies ersichtlich. Die sowohl im hypo- als auch im hypertonen Medium, im Gegensatz zur Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien bedeutend höher liegende Anzahl "lebender" (ungefärbter) Spermien deutet darauf hin, daß diese Noxe zwar eine Immobilisierung verursacht, die jedoch nicht mit dem gleichzeitigen Zelltod verbunden ist.

Bisher wurde nur auf die Problematik eingegangen, wie tertiäre Anomalien durch den Einfluß der in dieser Arbeit überprüften Noxen entstehen können. Genauso ist es vorstellbar, daß Formveränderungen auch durch die Präparationstechnik, die zur Auswertung der Spermienmorphologie erforderlich ist, verursacht werden. Hierbei kommen die Samenzellen mit höchst unphysiologischen Flüssigkeiten, wie z.B. Fixierungs- oder Farbstofflösungen in Berührung. Zusätzlich kommt es bei einer Färbetechnik noch zu einer hohen mechanischen Beanspruchung der Spermien durch den Vorgang der Ausstrichtechnik.

Bei der vergleichenden Betrachtung von Flüssigfixierung und Färbung ergab sich, daß der Anteil primärer Anomalien in einer Samenprobe durch die Präparation nicht beeinflusst wurde. Dies spricht für die geltende Theorie, daß solche schwerwiegenden

Formabweichungen im Laufe der Spermatogenese stattfinden und nicht sekundär provoziert werden können. Dagegen konnte nachgewiesen werden, daß die beiden eingesetzten Untersuchungstechniken den Anteil tertiärer Anomalien in unterschiedlicher Art und Weise beeinflussen können.

Die nach Färbung von Ausstrichen bestimmte Anzahl loser Spermienköpfe war generell höher als in den Flüssigpräparaten. Dies stimmt mit dem Schrifttum überein (HARASYMOWYCZ et al., 1976) und kann mit mechanischen Einflüssen der Ausstrich- und Färbetechnik erklärt werden. Eine geringere Empfindlichkeit gegenüber diesen mechanischen Einwirkungen scheinen Ziegenbockspermien zu haben. Bei dieser Spezies konnte statistisch kein Unterschied in der Anzahl der losen Köpfe zwischen beiden Methoden gefunden werden.

Über das durch die Flüssigfixierung hervorgerufene Auftreten von Schwanzkrümmungen liegen in der Literatur keine einheitlichen Ergebnisse vor. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Werte lassen diesbezüglich tierartliche Unterschiede erkennen. Bei Bulle, Schafbock und Eber traten sekundäre Schwanzanomalien sowohl bei der Flüssigfixierung als auch bei der Färbung in annähernd gleichen Prozentsätzen auf. Dagegen war bei Ziegenbock und Hengst nur in flüssigfixierten Proben eine Erhöhung der Schwanzkrümmungen zu beobachten. Offensichtlich werden durch die Flüssigfixierung bei Hengst- und Ziegenbockspermien morphologische Veränderungen hervorgerufen. Diese lassen den Anteil sekundärer Anomalien in der Auswertung ansteigen, wären aber als tertiäre Anomalien zu bezeichnen.

Der Prozentsatz der Summe der Spermienanomalien lag beim Bullen, Schafbock und Eber in den gefärbten Ausstrichen annähernd doppelt so hoch wie in den flüssigfixierten Proben. In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß die vergleichenden Untersuchungen in dieser Arbeit mit Ejakulaten durchgeführt wurden, deren Parameter der Norm entsprachen.

Im Hinblick auf die Beurteilung der Akrosomenalterationen kann die Färbetechnik artifizielle Schäden verursachen, d.h. das Ergebnis der mikroskopischen Auswertung dokumentiert eine größere Anzahl an Akrosomenveränderungen als tatsächlich in der Spermienprobe vorkommen. Andererseits ist es anhand der Flüssigfixierung und Phasenkontrastmethodik möglich, subtile Veränderungen am Akrosom zu erkennen, die färbetechnisch nicht darstellbar sind. Hierin läßt sich eine mögliche Erklärung für die sehr unterschiedlichen Ergebnisse, die diesbezüglich in der Literatur vorliegen, finden. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen lag der Anteil intakter Akrosome bei allen untersuchten Spezies in den gefärbten Präparaten niedriger als bei der Flüssigfixierung. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nur bei Bulle und Ziegenbock erkannt werden.

Somit kann für die Auswertung der Akrosomenmorphologie die Flüssigfixierung bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tierarten mit sicherlich genaueren Ergebnissen angewandt werden. Bei der Beurteilung von Schwanzkrümmungen sollten jedoch, insbesondere

bei Hengst- und Ziegenbockspermien und vor allem im Hinblick auf forensische Gesichtspunkte, vergleichende Untersuchungen mit einer Färbetechnik durchgeführt werden.

Parallel zur Phasenkontrast-Untersuchung wurde dieselbe flüssigfixierte Samenprobe unter Anwendung des Differential-Interferenzkontrast-Verfahrens ausgewertet. Die Gegenüberstellung der beiden mikroskopischen Verfahren ließ im Hinblick auf die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen keine Unterschiede erkennen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von KNAUS und SHANDOMO (1977). Als Nachteil der Differential-Interferenzkontrast-Methode geben sie eine längere Auswertungszeit an. Dies konnte in eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Sicherlich ist das mit dem Differential-Interferenzkontrast Verfahren plastisch erscheinende Bild gewöhnungsbedürftig; es erfordert, wie auch die Interpretation eines Phasenkontrastbildes, eine gewisse Einarbeitungszeit.

Die Entscheidung für die eine oder andere Methodik wird vom subjektiven Empfinden des Untersuchers und der ihm gebotenen Möglichkeiten abhängen. Objektive Vor- oder Nachteile konnten im Rahmen dieser Arbeit in keiner der beiden mikroskopischen Darstellungstechniken gefunden werden.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, daß Anomalien tertiär erst unter extremen Bedingungen in bedeutenden Maßstäben auftreten. Eine Differenzierung oder Abgrenzung gegenüber sekundär entstandenen Anomalien (Krümmlingen) oder auch

Artefakten (losen Köpfen) ist nicht möglich. Deshalb kann im Rahmen einer üblichen morphologischen Spermauntersuchung an einem einfachen, in primäre und sekundäre Anomalien eingeteilten Schema festgehalten werden. Beim Auftreten eines über die physiologischen Grenzen hinausgehenden Anteils sekundärer Anomalien sollte jedoch neben den möglichen Entstehungsursachen im Nebenhoden auch eine Überprüfung der Bedingungen, unter denen die Spermauntersuchung erfolgte, stattfinden.

Ein bedeutend empfindlicher reagierender Indikator für die Schädigung einer Samenzelle ist neben der Motilität die morphologische Veränderung des Akrosoms. Sie wurde, wie im Schrifttum üblich, getrennt von primären und sekundären Formveränderungen aufgeführt. Bezüglich Zeitaufwand, guter Auswertbarkeit und artefaktarmer Darstellung ist - insbesondere für die Beurteilung der Akrosomenmorphologie - die Untersuchung mit Hilfe einer Flüssigfixierung von beachtlichem Vorteil.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung "tertiärer" Anomalien für die Beurteilung der Spermienmorphologie bei Bulle, Schaf- und Ziegenbock sowie Hengst und Eber zu überprüfen. Dazu wurden Spermaproben dieser Tierarten den spezifischen Noxen Temperaturerniedrigung, Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration und Veränderung der Osmolalität ausgesetzt.

Die Spermienmorphologie wurde parallel an gefärbten Ausstrichpräparaten (Färbung nach Farelly) mit Hellfeldbetrachtung und an flüssigfixierten Proben (Formolsalzlösung nach Hancock) sowohl mit dem Phasenkontrast- als auch dem Differential-Interferenzkontrast-Verfahren bei einem Vergrößerungsfaktor von 1250 (Objektiv 100/Oel x Tubus 1,25 x Okular 10) ausgewertet. Daneben wurden Motilität und Vitalität (Färbung Bromphenolblau-Nigrosin) beurteilt.

Eine langsame bzw. schnelle Abkühlgeschwindigkeit der verdünnten Samenproben bewirkte nur geringgradige Formveränderungen im Sinne tertiärer Anomalien, jedoch eine deutliche, tierartlich unterschiedliche Zunahme an Akrosomenschädigungen.

Durch Verdünnung des Samens mit Medien von pH 5 und pH 9 ließen sich keine tertiären Anomalien provozieren. Akrosomenschädigungen traten in geringem Umfang bei allen untersuchten Spezies auf.

Ein signifikanter Anstieg der Spermienanomalien wurde durch die Verdünnung des Spermas mit hypotonen Medien (150 mosm/kg) ausgelöst. Die hierbei aufgetretenen Formveränderungen (Schwanzkrümmungen), lassen sich nicht von sekundären Anomalien unterscheiden. Eine ausgeprägte Schädigung des Akrosoms trat nur beim Bullen im extrem hypertonen Verdünner (1200 mosm/kg) auf.

Die Ergebnisse des Vergleichs zwischen Färbung und Flüssigfixierung ließen generell einen höheren Prozentsatz an Artefakten, insbesondere losen Köpfen, im gefärbten Ausstrichpräparat erkennen. Bei Hengst und Ziegenbock fanden sich bei der Flüssigfixierung vermehrt Schwanzkrümmungen.

Zwischen den beiden mikroskopischen Verfahren Phasenkontrast und Differential-Interferenzkontrast zeigten sich keine Unterschiede in bezug auf die Ergebnisse der morphologischen Auswertung.

Für die lichtmikroskopische Untersuchung der Spermienmorphologie erwies sich die Flüssigfixierung als vorteilhaft.

7. SUMMARY

The significance of tertiary anomalies for the evaluation of sperm morphology

The aim of this study was to determine the occurrence of so-called "tertiary anomalies" in spermatozoa from different domestic animals (cattle, sheep, goat, horse and pig). Semen samples were exposed to various experimental treatments such as a sudden drop of temperature or non-physiological pH and osmolality.

Sperm morphology was assessed in stained smears according to FARELLY (1250x oil immersion, bright field) as well as in samples fixed in a formol saline according to HANCOCK (1250x oil immersion, phase contrast and differential-interference contrast optics). In addition, spermatozoal motility was determined subjectively and the percentage of "live" spermatozoa was estimated after staining with Bromphenolblue-Nigrosin.

Slow and fast cooling between +25°C and +5°C did not provoke a significant increase of gross morphological anomalies. The percentage of spermatozoa with acrosomal defects varied between the species investigated.

No tertiary anomalies occurred after treatment with semen extenders adjusted to pH 5 or 9. Moreover, only a small number of acrosomal defects was recorded.

Extending semen with media of low osmolality (150 mosm/kg) led to a remarkable increase of tertiary anomalies (bent tails). However, these anomalies are indistinguishable from secondary anomalies. Acrosomal defects were observed only in bull spermatozoa after hypertonic treatment (1200 mosm/kg).

The smear procedure resulted in a higher percentage of artificially produced anomalies (head - tail separated spermatozoa). In spermatozoa from horse and goat, fixation of semen samples with formol saline led to an increased number of bent sperm tails. Evaluation of semen samples with phase contrast or differential-interference contrast gave comparable results.

Fixation of semen samples in formol saline offers distinct advantages for the assessment of sperm morphology.

8. Literaturverzeichnis

- AALSETH, E.P. and R.G. SAAKE (1981):
Effect of fructose concentration and pH on the acrosome to motile bovine sperm.
J.Anim.Sci. 53, Suppl. 1, 292.
- AALSETH, E.P. and R.G. SAAKE (1985):
Morphological change of the acrosome on motile bovine spermatozoa due to storage at 4° C.
J.Reprod.Fert. 74, 473-478.
- BAUER, H.J. und O. LIEBENBERG (1976):
Untersuchungen zum Einfluß der Verdünnung, Äquilibrierung und des Auftauens von Schafbocksperma bei dessen Tiefgefrierkonservierung nach dem Pelletverfahren.
Arch.Tierzucht 4, 283-293.
- BAUMGARTL, C. (1980):
Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über Veränderungen der Plasmamembran und Akrosomstruktur von Pferdespermien.
Vet.med.Diss., Hannover.
- BEUTEL, W. und W. SCHUBÖ (1983):
Statistikprogrammsystem für die Sozialwissenschaften.
SPSS 9 nach NIE N.H. und C.H. HULL, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, NY, 4.Auflage.
- BIELANSKI, W. (1975):
The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination.
J.Reprod.Fert., Suppl. 23, 19-24.
- BLACKSHAW, A.W. (1954):
The prevention of temperature shock of bull and ram semen.
Aust.J.Biol.Sci. 7, 573-582.
- BLACKSHAW, A.W. and C.W. EMMENS (1951):
The interaction of pH, osmotic pressure and electrolyte concentration on the motility of ram, bull and human spermatozoa.
J.Physiol. 114, 16-26.
- BLACKSHAW, A.W. and G.W. SALISBURY (1957):
Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa.
II. Cold shock and its prevention.
J.Dairy Sci. 40, 1099-1106.
- BLOM, E. (1943):
A new and uncomplicated method for the staining of bullsperms.
Skand.Vet.Tidskr. 33, 428-431.
- BLOM, E. (1950):
Interpretation of spermatid cytology in bulls.
Fert.Steril. 1, 223-238.

BOENDER, J. (1968):

Morphological changes of the acrosome of boar spermatozoa during aging and cold shock.

IV.Congr.Intern.Reprod.Anim.Artif.Insem., Paris, Vol. 2, 1217-1220.

BOLLWAHN, W. und D. GROVE (1972):

Die klinisch andrologische Untersuchung von Zuchtebern.

Der prakt.Tierarzt 5, 182-186.

BONNADONNA, T. e L. OLGIATTI (1953):

Dell'identificazione dei nemaspermici di "Bos taurus" vivi e morti con la colorazione bleu bromo-fenolo e nigrosina.

Zootec.vet. 8, 195-199.

BREDDERMANN, P.J. and R.H. FOOTE (1969):

Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmic droplets and the relationship of cell size to motility and fertility.

J.Anim.Sci. 28, 496-501.

CAMERON, R.D.A. (1977):

Semen collection and evaluation in the ram.

Austr.Vet.J. 53, 384-386.

CAMPBELL, R.C., J.L. HANCOCK and I.G. SHAW (1960):

Cytological characteristics and fertilizing capacity of bull spermatozoa.

Agric.Sci. 55, 91-99.

CHANG, M.C. and T. THORSTEINSSON (1958):

Effects of osmotic pressure and hydrogenion concentration on the motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa.

Fert.Steril. 2, 510-520.

CHONG, C.H. and R.G. WALES (1962):

The effect of cold shock on spermatozoa.

Austr.J.Biol.Sci. 15, 543-551.

CRABO, B.G. and E.F. GRAHAM (1972):

Correlation between some laboratory methods for evaluation of boar semen after freezing.

VII.Intern.Congr.Anim.Reprod.Artif.Insem., Vol. 2, 1639-1644, München.

DAVIS, J.S., R.W. BRATTON and R.H. FOOTE (1963):

Liveability of bovine spermatozoa at +5° C in tris-buffered and citrate buffered yolk-glycerol-extenders.

J.Dairy Sci. 46, 57-60.

DOTT, H.M. (1975):

Morphology of stallion spermatozoa.

J.Reprod.Fert., Suppl. 23, 41-46.

- DOTT, H.M. and G.C. FOSTER (1975):
Preservation of differential staining of spermatozoa by formal citrate.
J.Reprod.Fert. 45, 57-60.
- DREVIUS, L.-O. (1963):
Spiralisation in tails of mammalian spermatozoa in hypotonic media.
Nature 197, 1123-1124.
- DREVIUS, L.-O. (1972):
Bull spermatozoa as osmometers.
J.Reprod.Fert. 28, 29-39.
- DREVIUS, L.-O. and H. ERIKSSON (1966):
Osmotic swelling of mammalian spermatozoa.
Exp.Cell Res. 42, 136-156.
- DZIUK, P.J. (1958):
Dilution and storage of boar semen.
J.Anim.Sci. 17, 548-553.
- EIBL, K. (1959):
D. Die Untersuchung und Auswahl der Ejakulate zur Samenübertragung.
In: Lehrbuch der Rinderbesamung, Ed.: EIBL, K., 60-91, Paul Parey Verlag, Berlin.
- EL AZAB, A.E. (1966):
Die Auswirkungen lokaler Wärmeapplikation am Skrotum auf Spermato-genese, Reifung der Spermien im Nebenhoden und Spermabeschaffenheit bei Kaninchen und Stieren.
Vet.med.Diss., München.
- ELIASSON, R. (1977):
Supravital staining of human spermatozoan.
Fert.Steril. 28, 1257.
- EMMENS, C.W. (1947):
The motility and viability of rabbit spermatozoa at different hydrogen ion concentrations.
J.Physiol. 106, 471-481.
- FISER, P.S. and G.A. LANGFORD (1981):
Cryosurvival of ram sperm as influenced by diluent osmolality.
Fert.Steril. 36, 265-266.
- GOTTARDI, L., L. BRUNEL and L. ZANELLI (1980):
New dilution media for artificial insemination in pig.
IX.Intern.Congr.Anim.Reprod.Artif.Insem., Madrid, Vol. 5, 49-53.
- HAASE, H., S. BACH, K.H. STEMMLER und F. MÜLLER (1977):
Morphologische Spermauntersuchung beim Bullen unter besonderer Berücksichtigung der Phasenkontrastmikroskopie.
Mh.Vet.Med. 32, 941-944.

- HANCOCK, J.L. (1951):
A staining technique for the study of temperature shock in semen.
Nature 167, 323-324.
- HANCOCK, J.L. (1956):
IV. The morphology of boar spermatozoa.
J.Roy.Micr.Soc. 76, 84-97.
- HARASYMOWYCZ, J., L. BALL and G.E. SEIDEL (1976):
Evaluation of bovine spermatozoal morphologic features after staining or fixation.
Am.J.Vet.Res. 37, 1053-1057.
- HEALEY, P. (1969):
Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoa of some domestic animals.
J.Reprod.Fert. 18, 21-27.
- HILLMANN, K.H. und H. TREU (1973):
Darstellung und Messung morphologischer und enzymatischer Veränderungen beim Tiefgefrieren von Ebersperma.
Zuchthyg. 8, 105-112.
- HURTGEN, J.P., R. LARSEN and B. CRABO (1980):
Factors affecting semen quality in the boar.
Proc.VI.Congr.Int.Pig Vet.Soc., 39-40, Kopenhagen.
- JOHNSON, L., W.E. BERNDTSON and B.W. PICKETT (1976):
An improved method for evaluating acrosomes of bovine spermatozoa.
J.Anim.Sci. 42, 951-954.
- JONES, R.C. and I.C.A. MARTIN (1973):
The effect of dilution, egg yolk and cooling to 5° C on the ultrastructure of ram spermatozoa.
J.Reprod.Fert. 35, 311-320.
- KARRAS, W. (1965):
Zur Pathologie der Galea Capitis.
I. Diagnostik und färberische Darstellung des persistierenden Akrosoms.
Berl.Munch.Tierärztl.Wschr. 21, 402-406.
- KLENNER, A. (1975):
Auswirkungen der Tiefgefrierkonservierung auf die Akrosin- und GOT-Aktivität sowie die Akrosomenmorphologie von Eberspermien.
Vet.med.Diss., München.
- KNAUS, E. und M.N. SHANDOMO (1977):
Zur Darstellung pathologischer Kaninchen- und Eberspermatozoen.
Wien.Tierärztl.Mschr. 64, 350-355.
- KÖLLIKER, A. (1856):
Physiologische Studien über die Samenflüssigkeit.
Z.Wiss.Zool. 7, 201-272.

KOLK, J. (1985):

Ziegenbesamung - problemlose Tiefgefrierung und praxisgerechte Besamung.

Der prakt.Tierarzt 66, 490-492.

KOUTSOURIS, C.D. und H. VAUPEL (1973):

Tiefgefrierung von Schafbocksperma in Pelletform mit unterschiedlichen Abkühlverfahren vor dem Einfrieren.

Zuchthyg. 8, 163-170.

KUNZE, C., D. SCHMIDT und D. BIERWOLF (1971):

Morphologische Veränderungen an Eberspermienköpfen bei der Gefrierkonservierung.

Mh.Vet.Med. 27, 103-106.

LAGERLÖF, N. (1934):

Morphologische Untersuchungen über Veränderungen im Spermiabild und in den Hoden bei Bullen mit verminderter oder aufgehobener Fertilität.

Acta Path.Microbiol.Scand., Suppl. 19, 1-254.

LARDY, H.A. and P.M. PHILLIPS (1943):

Effect of pH and certain electrolytes on the metabolism of ejaculated spermatozoa.

Am.J.Physiol. 138, 741-746.

LEIDL, W. (1966):

Zur Diagnose von Fruchtbarkeitsstörungen beim Bullen.

Fortpfl.Haust. 2, 179-185.

LEIDL, W. (1983):

Physiologische Beschaffenheit des Spermas der Haustiere.

In: Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren, 520-521, 6. Auflage, Eds.: SCHÄTZ, F. und W. LEIDL, Enke Verlag, Stuttgart.

LEIDL, W., W. SCHEFELS, R. STOLLA und E. METZGER (1971):

Differenzierung und Befruchtungsvermögen pathologischer Spermien.

Dtsch.Tierärztl.Wschr. 78, 129-134.

LEIDL, W. und G. SPECKER (1983):

Die Bedeutung des Nebenhodens für das Entstehen morphologisch anomaler Spermien.

Dtsch.tierärztl.Wschr. 90, 390-395.

MANN, T. (1964):

XII. Influence of ion concentration, dilution, temperature and other extraneous factors on semen in vitro.

In: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract, 339-364, Ed.: MANN, T., Methuen & Co. LTD, London.

MANN, T. and C. LUTWAK-MANN (1981):

Biochemical basis of interactions between the male accessory secretions and between the seminal plasma and spermatozoa.

In: Male reproductive function and semen, 319-325, Eds.: MANN, T. and C. LUTWAK-MANN, Springer Verlag, Berlin.

MARSHALL, C.E. (1978):

Use of DIK-optics as a quality control and research tool.
Proc.VII.Tech.Conf.Artif.Insem.Reprod., 62-63, Madison,
Wisconsin.

MELROSE, D.R. (1962):

Artificial insemination in cattle.

In: The semen of animals and artificial insemination, 2-143, Ed.
MAULE, J.P., Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal,
Bucks., England.

MELROSE, D.R. and J.A. LAING (1970):

The characteristics of normal semen.

In: Fertility and infertility in the domestic animals, Ed.:
LAING, J.A., 126-160, Baillere Tindall and Cassel, London.

MENGER, H. (1983):

6. Spermabeurteilung.

In: Schafbesamung, 99-119, Ed.: MENGER, H., Deutscher Landwirt-
schaftsverlag, Berlin.

MERCIER, E. and G.W. SALISBURY (1947):

Effect of techniques of preparing semensmears for staining on the
morphology of bull spermatozoa.

J.Anim.Sci. 6, 60-66.

MOSS, J.A., D.R. MELROSE, H.C.B. REED and M. VANDEPLASSCHE
(1979):

Spermatozoa, semen and artificial insemination.

In: Fertility and infertility in the domestic animals, Ed.:
LAING, J.A., 55-91, Baillere Tindall and Cassel, London.

MÜLLER, H., G. STERBA, G. BRÜCKNER, J. HOFMANN und J. LEHMANN
(1977):

Zur Genese der Plasmamembran-Veränderungen bei Schafbocksper-
mien.

Biol.Zbl. 96, 571-578.

MUKHERJEE, D.P. (1963):

Effect of pH and buffer composition of the fixative and period
prior to fixation on the abnormalities of bull spermatozoa.

Indian J.vet.Sci. 33, 178-186.

NISHIKAWA, Y. (1959):

Semen properties and artificial insemination in horses.

In: Studies on reproduction in horses, 206-278, Ed.: NISHIKAWA,
Y., Japan Racing Association, Shiba Tamuracho Minatoku, Tokyo.

NORMAN, C. and C.E. JOHNSON (1958):

Effect of pH on the life-span and metabolism of bovine sperm kept
at room temperatures.

J.Dairy Sci. 41, 1803-1812.

- OKO, R.J., J.W. COSTERION and G.H. COULTER (1976):
An ultrastructural study of the head region of bovine spermatozoa.
Can.J.Zool. 54, 1326-1339.
- ONUMA, H. (1963):
Studies on the acrosomic system of spermatozoa of domestic animals.
VI. The acrosomic system of spermatozoa in fresh semen of bulls and boars and its morphological changes due to storage or temperature shock.
Bull.Nat.Inst.Anim.Ind., 3, 105-119, Tokyo.
- PAUFLER, S.K. (1974):
Die künstliche Besamung beim Rind.
In: Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Mensch und Tier, 48-80, Ed.: PAUFLER, S.K., M. und H. Schaper, Hannover.
- PICKETT, B.W., D.C. BURWASH, J.L. VOSS and D.G. BUCK (1975):
Effect of seminal extenders on equine fertility.
J.Anim.Sci. 40, 1136-1143.
- POLGE, C. (1956):
Artificial insemination in pigs.
Vet.Rec. 68, 62-76.
- PURSEL, V.G., L.A. JOHNSON and G.B. RAMPACEK (1972a):
Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock.
J.Anim.Sci. 34, 278-283.
- PURSEL, V.G., L.A. JOHNSON and L.L. SCHULMANN (1972b):
Interaction of extenders composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa.
J.Anim.Sci. 35, 580-584.
- PURSEL, V.G. and L.A. JOHNSON (1974):
Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation.
Theriogenology 1, 63-68.
- PURSEL, V.G., L.A. JOHNSON and L.L. SCHULMANN (1974):
Acrosome morphology of boar spermatozoa during in vitro aging.
J.Anim.Sci. 38, 113-116.
- PURSLEY, G.R. and H. HERMANN (1950):
Some effects of hypertonic and hypotonic solutions on the liveability and morphology of bovine spermatozoa.
J.Dairy Sci. 33, 220-227.
- QUINN, P.J. and I.G. WHITE (1966):
The effect of cold shock and deep freezing on the concentration of major cations in spermatozoa.
J.Reprod.Fert. 12, 263-270.

QUINN, P.J. and I.G. WHITE (1968):

The effects of pH, cations and protective agents on the susceptibility of ram spermatozoa to cold shock.
Exp.Cell Res. 49, 31-39.

QUINN, P.J. and I.G. WHITE (1969):

Osmotic shock of ram spermatozoa.
J.Reprod.Fert. 18, 375-377.

QUINN, P.J., S. SALAMON and I.G. WHITE (1968):

The effect of cold shock and deep-freezing on ram spermatozoa collected by electrical ejaculation and by an artificial vagina.
Aust.J.agric.Res. 19, 119-128.

RAO, C.K. (1957):

Effect of fixatives on the staining and morphology of spermatozoa.

Vet.Rec. 69, 853-855.

ROBERTS, S.J. (1971):

XVIII. Infertility in male animals.

In: Veterinary obstetrics and genital diseases, 604-725, Ed.:

ROBERTS, S.J., Edwards Brothers, Inc. Ann Arbor, Michigan.

ROMMEL, W. (1966):

Differenzierung pathologischer Spermaformen durch Schnellfärbemethode (nach Farelly).

In: Zuchthygienisches Laboratorium, Sperma originär, 6.2, Ed.:

Rommel, W., S. Hirzel Verlag, Leipzig.

SAAKE, R.G. and C.E. MARSHALL (1968):

Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa.

J.Reprod.Fert. 16, 511-514.

SALISBURY, G.W., E.L. WILLET and J. SELIGMANN (1942):

The effect of method of making semen smears upon the number of morphologically abnormal spermatozoa.

J.Anim.Sci. 1, 199-205.

SALISBURY, G.W. and W.C. KINNEY (1957):

Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa.
III. pH.

J.Dairy Sci. 40, 1343-1349.

SALISBURY, G.W. and N.L. VAN DEMARK (1961):

Part two: The storage and the planting.

In: Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle, 201-459, Eds.: SALISBURY, G.W. and N.L. VAN DEMARK, Freeman and Company, San Francisco.

SALAMON, S., W.M.L. MAXWELL and J.H. FIRTH (1977):

Fertilizing capacity of ram spermatozoa stored at 5° C.
Therlogenology 8, 200.

- SCHLEICHER, J. und G. BRÜCKNER (1973):
Ultrastrukturelle Befunde an flüssigkonservierten Schafbockspermien bei Einsatz verschiedener Puffersubstanzen.
Mh.vet.med. 28, 391-395.
- SCHÜLKE, B. (1982):
Grundstruktur der Spermienzelle und Grundzüge der Biochemie des Spermas.
In: Künstliche Besamung bei Nutztieren, 159-181, Eds.: BUSCH, W., K. LÖHLE und W. PETER, Enke Verlag, Stuttgart.
- SEKONI, V.O., B.K. GUSTAFSSON and E.C. MATHER (1981):
Influence of wet fixation, staining techniques and storage time on bull sperm morphology.
Nordisk Vet.Med. 33, 161-166.
- SMIDT, D. (1965):
Möglichkeiten der Beurteilung der "Spermaqualität" und Bedeutung der Befunde.
In: Die Schweinebesamung, 165-179, Ed.: SMIDT, D., M. und H. Schaper, Hannover.
- STEINBACH, J. and R.H. FOOTE (1964):
Post-thaw survival of bovine spermatozoa frozen by different methods in buffered-yolk and skimmilk extenders.
J.Dairy Sci. 47, 909-915.
- STEINBACH, J. and R.H. FOOTE (1967):
Osmotic pressure and pH effects on survival of frozen bovine spermatozoa.
J.Dairy Sci. 50, 205-213.
- STEVERMER, E.J., N.L. FIRST and W.G. HOEKSTRA (1964):
Effect of osmotic pressure on boar spermatozoa.
J.Anim.Sci. 23, 67-70.
- STOLLA, R. (1984):
Ursachen der Teratozoospermie.
In: Ursachen und Bedeutung der Teratozoospermie, 8-81, Ed.: STOLLA, R., Enke Verlag, Stuttgart.
- SWANSON, E.W. and L.J. BOYD (1962):
Factors affecting coiled-tail spermatozoa in the bull.
Am.J.Vet.Res. 23, 300-309.
- TASSERON, F., D. AMIR and H. SCHINDLER (1977):
Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing.
J.Reprod.Fert. 51, 461-462.
- TISCHNER, M., M. NYTKO and W. BIELANSKI ((1980):
The effect of osmotic pressure on the velocity of stallion spermatozoa.
IX.Intern.Congr.Anim.Reprod.Artif.Insem., Vol. 5, 343-346, Madrid.

VENGUST, M. (1983):

Untersuchungen zur osmotischen Resistenz von Eberspermien und die Ermittlung eines osmotischen Resistenzwertes zur Beurteilung der Konservierungsfähigkeit von Ejakulaten.

Vet.med.Diss., Hannover.

WALES, R.G. and I.G. WHITE (1959):

The susceptibility of spermatozoa to temperature shock.

J.Endocr. 19, 211-220.

WALTON, A. (1957):

Cold shock of spermatozoa.

Proc.Roy.Soc. 147, 508-509.

WARNAWSKI, A.N. (1971):

Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen von Kälteschäden an Bullen- und Schafbockspermien.

Fortpfl.Haust. 7, 15-33.

WATSON, P.F. and I.C.A. MARTIN (1972):

A comparison of changes in the acrosomes of deep frozen ram and bull spermatozoa.

J.Reprod.Fert. 28, 99-101.

WATSON, P.F. and J.M. PLUMMER (1985):

The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling.

Proc.I.Intern.Conf.Deep Freezing of Boar Semen, 113-127, Upsala.

WEITZE, K.F. (1977):

Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Kaninchensperma.

Habil.-Schr., Hannover.

WILLIAMS, W.W. and A. SAVAGE (1925):

Observations on the seminal micropathology of bulls.

Cornell Vet. 15, 353-375.

YASSEN, A.M. and R.H. FOOTE (1967):

Freezability of bovine spermatozoa in tris-buffered yolk extenders containing different levels of tris, sodium, potassium and calcium ions.

J.Dairy Sci. 50, 887-892.

Lebenslauf

Am 17. Juli 1955 wurde ich als Sohn des Chemikers Dr.-Ing. Horst Würgau und seiner Ehefrau Dr. med. vet. Ursula, geb. Albrecht, in Berlin-Wilmersdorf geboren.

Von 1962 bis 1966 besuchte ich die Volksschulen in Walsrode, Würzburg und Wiesbaden, anschließend von 1966 bis 1976 das Diltz-Gymnasium in Wiesbaden und das Siebold-Gymnasium in Würzburg, an dem ich 1976 die allgemeine Hochschulreife erlangte.

Vom 1. Juli 1976 bis 30. Juli 1977 leistete ich den Grundwehrdienst bei der Techn. Marineschule Neustadt ab.

Zum Wintersemester 1977/78 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Tiermedizin, das ich am 15. Juni 1983 mit dem Staatsexamen abschloß.

Von Januar 1984 bis April 1986 war ich an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.

Herrn Professor Dr. W. Leidl danke ich für die Überlassung des
Themas und die gewährte Hilfestellung.

Allen Mitarbeitern unseres Hauses, insbesondere Herrn Privat-
dozent Dr. R. Stolla gilt mein Dank für die Unterstützung, die
mir bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit zuteil wurde.

